

Rec'd PCT/PTO 03 FEB 2005

528 400
10/523400

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
19 février 2004 (19.02.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/014952 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

C07K 16/26

Major Flandre, F-34090 MONTPELLIER (FR). RIEUNIER, François [FR/FR]; 5, rue du Bois, F-78390 BOIS D'ARCY (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2003/002483

(74) Mandataires : BERNASCONI, Jean etc.; CABINET LAVOIX, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 PARIS CEDEX 09 (FR).

(22) Date de dépôt international : 7 août 2003 (07.08.2003)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

02 10063 7 août 2002 (07.08.2002) FR

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : BIO-RAD PASTEUR [FR/FR]; 3, boulevard Raymond Poincaré, F-92430 MARNES LA COQUETTE (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75016 PARIS (FR). UNIVERSITE MONTPELLIER I [FR/FR]; Boulevard Henri IV, F-34060 MONTEPELLIER CEDEX 1 (FR).

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : PAU, Bernard [FR/FR]; Le Mas Clos n°6, Rue Sainte Geneviève, F-34080 MONTPELLIER (FR). GIULIANI, Isabelle [FR/FR]; Résidence Occitanie, 200, avenue du

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: SPECIFIC ANTIBODIES FOR DIAGNOSING HEART FAILURE

(54) Titre : ANTICORPS SPECIFIQUES POUR LE DIAGNOSTIC DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE

(57) Abstract: The invention relates to in vitro diagnosis of heart failure. More specifically, the invention relates to specific antibodies of a peptide domain which is situated on either side of hinge region R76S77 of proBNP(1-108). In particular, the invention relates to a method of obtaining the aforementioned antibodies and to the use thereof in detecting blood proBNP(1-108) with the exception of BNP(1-76) and BNP(77-108). The invention also relates to a method of detecting blood proBNP(1-108), reagents and a kit for same.

(57) Abrégé : L'invention concerne le domaine du diagnostic in vitro de l'insuffisance cardiaque. L'invention concerne plus particulièrement des anticorps spécifiques d'un domaine peptidique situé de part et d'autre de la zone charnière R76S77 du proBNP(1-108). L'invention concerne plus particulièrement un procédé d'obtention de ces anticorps et leur utilisation pour détecter le proBNP(1-108) sanguin à l'exclusion du BNP(1-76) et du BNP(77-108). L'invention concerne aussi un procédé de détection du proBNP(1-108) sanguin, des réactifs et une trousse pour le mettre en oeuvre.

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/014952 A2

Anticorps spécifiques pour le diagnostic de l'insuffisance cardiaque

L'invention concerne le domaine du diagnostic *in vitro* de l'insuffisance cardiaque ventriculaire.

5 L'insuffisance cardiaque (Congestive heart failure) est un syndrome clinique fréquent, en particulier chez les personnes âgées. Il se présente habituellement sous la forme d'un déclenchement insidieux de symptômes non-spécifiques tels que la toux à l'effort, la fatigue, et l'apparition d'œdèmes périphériques. Le diagnostic repose classiquement sur l'étude de divers
10 paramètres tels que les signes cliniques (classés en 4 stades: stades I à IV de la NYHA (c'est-à-dire de l'Association de Cardiologie de New York), l'échocardiographie, la scintigraphie, le test d'effort, etc..

En raison de la gravité de la maladie cardiaque et, aussi, des coûts élevés de sa prise en charge, un diagnostic précoce de ce syndrome est,
15 évidemment, très hautement souhaitable : il contribuerait à éviter la progression rapide du syndrome vers l'insuffisance cardiaque sévère. Identifier les personnes à risque d'insuffisance cardiaque est donc une nécessité. Cela permettrait aussi d'adapter un suivi thérapeutique plus rapide, plus facile et moins coûteux. Malheureusement, il n'existe pas de méthode diagnostique de
20 l'insuffisance cardiaque totalement satisfaisante et totalement informative.

On a recherché depuis longtemps des marqueurs présymptomatiques prédictifs de l'insuffisance cardiaque. A cet égard, on a mis en évidence le fait que les cardiomyocytes fabriquent et sécrètent des peptides à activité natriurétique : un peptide d'origine auriculaire, l'ANP (Atrial Natriuretic Peptide)
25 découvert chez le rat par de Bold et al. *Life Science* 1981, vol. 28(1) : 89-94, et un peptide natriurétique d'origine auriculo-ventriculaire dénommé BNP (Brain Natriuretic Peptide) découvert par Sudoh et al., *Nature* 1988, vol. 332 : 78-81 chez le porc, puis ensuite chez l'homme.

Le précurseur du BNP est le préproBNP(1-134), forme de stockage de
30 la molécule à l'intérieur des cardiomyocytes. Celui-ci est clivé pour libérer un peptide signal et le proBNP(1-108). Le proBNP(1-108) consiste en un polypeptide de 108 acides aminés, de séquence:

H₁PLGSPGSASDLETSGLQEQRNHLQGKLSLEPLQESPRPTGV
WKSREVATEGIRGHRKMLVLYTLRAPR₇₆S₇₇PKMVQSGSGCFGRKMDRISSSSG
LGCKVLRRH₁₀₈ (SEQ ID N° 1). Il est clivé, avant et/ou pendant sa sécrétion,
entre les acides aminés Arg⁷⁶ et Ser⁷⁷ en, d'une part, le BNP, encore désigné
5 BNP(77-108) ou BNP-32, voire BNP(1-32), et la partie N-terminale de la
prohormone, le BNP(1-76), encore désigné fragment N-terminal du proBNP ou
NT-proBNP.

Le BNP ou BNP(77-108), forme vasoréactive de la molécule, consiste en un
peptide de 32 acides aminés, de séquence :

10 S₇₇PKMVQSGSGCFGRKMDRISSSSGLGCKVLRRH₁₀₈ (SEQ ID N° 2).

Le NT-proBNP ou BNP(1-76) consiste en les 76 acides aminés N-terminaux du
proBNP(1-108) constituant la séquence suivante :

H₁PLGSPGSASDLETSGLQEQRNHLQGKLSLEPLQESPRPTGV
WKSREVATEGIRGHRKMLVLYTLRAPR₇₆ (SEQ ID N° 3).

15 Le taux plasmatique de BNP hormonal, le BNP(77-108), est élevé chez
les patients présentant une dystrophie ventriculaire. On a d'ailleurs décrit des
dosages plasmatiques du BNP(77-108) l'utilisant comme marqueur prédictif de
l'insuffisance cardiaque ventriculaire. Cependant, il est bien connu que
l'hormone BNP(77-108) est peu stable. Il en résulte que son dosage nécessite
20 des précautions particulières (Davidson, N. C. et al. Circulation 1995; 91:1276)
(Gobinet-Georges et al. Clin. Chem. Lab. Med. 2000; 38:519-23). De plus, la
demi-vie du BNP très courte et sa concentration plasmatique est peu élevée. Il
en résulte qu'un certain nombre de réponses faussement négatives sont
observées chez des sujets à risque d'insuffisance cardiaque. Ainsi, le dosage
25 du BNP(77-108) ne permet pas de discriminer correctement les patients en
stade I de la classification NYHA, des sujets sains (Clerico A. et al. J.
Endocrinol. Invest. 1998; 21:170-9) (Del Ry S. et al. Scand. J. Clin. Lab. Invest.
2000; 60:81-90).

Pour contourner cette difficulté, la demande de brevet WO 93/24531
30 décrit une méthode de diagnostic *in vitro* de l'insuffisance cardiaque reposant
sur la détection du BNP(1-76) (fragment N-terminal du proBNP), un composé
abondant et qui a une longue demi-vie en comparaison de celle de l'hormone
BNP(77-108). Toutefois, la méthode décrite dans la demande WO 93/24531

ne paraît pas simple à mettre en œuvre sur le BNP(1-76) en échantillons sanguins. En effet, les seuls exemples montrés sont réalisés, non sur des sérums réels, mais sur des gammes étalons obtenues à l'aide d'un peptide synthétique, le peptide BNP(47-64), sous-séquence du BNP(1-76). Pour pallier
5 cet inconvénient, un système automatisé hautement sophistiqué s'est avéré, depuis, nécessaire.

L'article Hunt et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 214(3), 1995, pp. 1175-1183 décrit un dosage RIA de type compétitif du BNP(1-76) sur plasmas de patients souffrant d'insuffisance
10 cardiaque, faisant intervenir un antisérum dirigé contre le fragment N-terminal du proBNP(1-13). L'article montre précisément que, chez des insuffisants cardiaques, le taux de BNP(1-76), très bien corrélé à celui du BNP(77-108), est considérablement élevé par rapport au taux observé chez des sujets témoins. Cependant, le protocole décrit pour extraire spécifiquement le seul BNP(1-76)
15 plasmatique est complexe, puisqu'il nécessite une extraction du plasma sur cartouche Sep-pak C18™ (Millipore-Waters), suivie d'une chromatographie HPLC. Par ailleurs, cet article souligne que, dans le dosage RIA ainsi mis en œuvre, le proBNP(1-108) ne paraît pas reconnu. Il suggère plutôt que le proBNP(1-108) pourrait être sécrété dans la circulation à partir du tissu
20 cardiaque mais serait ensuite rapidement dégradé en un peptide plus petit, par clivage des acides N-terminaux. Ou encore, selon l'article, le proBNP(1-108) serait présenté d'une façon telle que l'antisérum anti proBNP(1-108) serait incapable de se lier à lui. Enfin, les auteurs suggèrent que le BNP(1-76) (fragment N-terminal du proBNP) pourrait même être un marqueur plus
25 spécifique du dysfonctionnement cardiaque que le BNP(77-108) ou que le fragment N-terminal du proANP.

L'article Karl et al. (*Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1999 ; 59(suppl 230) : 177-181) décrit une méthode de détection du BNP(1-76) similaire à celle de la demande de brevet WO93/24531, mais il ne fournit aucun résultat
30 obtenu sur échantillons de patients.

L'article Schulz et al. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 2001, vol. 61, pp. 33-42, décrit également un dosage radioimmunologique spécifique du BNP(1-76) (fragment N-terminal du proBNP), sans extraction, à l'aide d'un

antisérums dirigés contre les acides aminés 1-21 de ce fragment. Les auteurs confirment l'intérêt du dosage du BNP(1-76) en diagnostic de l'insuffisance cardiaque ventriculaire ainsi que sa bonne corrélation avec le dosage du BNP(77-108). Lors d'une étude des différentes formes circulantes du proBNP(1-108), ils avancent l'hypothèse que le proBNP(1-108) circulerait dans le sang, à la fois sous forme de prohormone intacte et de produits de clivage, BNP(1-76) (fragment N-terminal du proBNP) et BNP(77-108). Cependant rien n'est dit ou suggéré dans l'article concernant une éventuelle activité physiologique du proBNP(1-108) ou un intérêt diagnostique quelconque du proBNP(1-108) en tant que marqueur prédictif ou diagnostique de l'insuffisance cardiaque ventriculaire.

L'article Shimizu et al. *Clinica Chimica Acta*, 2002, vol. 316, pp. 129-135, présente une étude sur la dégradation du BNP humain dans le sang et les formes moléculaires circulantes de BNP immunoréactif dans le plasma d'insuffisants cardiaques. Il observe dans le plasma de ces derniers la présence de deux formes de BNP immunoréactif : un BNP de haut poids moléculaire (de 36 KD, qui pourrait correspondre à un trimère du proBNP(1-108)) et un BNP de bas poids moléculaire. Ce dernier correspond à la présence simultanée d'une forme de produit de dégradation du BNP-32 ayant perdu la sérine et la proline N-terminales (c'est la des-SerPro-BNP (BNP3-32)) de la forme hormonale du BNP-32 (ici appelée BNP(1-32)). Le proBNP(1-108) et le BNP hormonal (BNP-32, BNP(1-32) ou encore BNP(77-108)) sont donc sécrétés par le cœur dans le sang. Néanmoins, les auteurs semblent suggérer que le proBNP(1-108) sous sa forme oligomérisée (trimère) est présent en concentration proche de celle du BNP(77-108) circulant, mais ils ne la mesurent pas. Par voie de conséquence, la corrélation de la concentration du proBNP(1-108) avec l'état clinique des patients n'est pas étudiée. Il s'ensuit que l'intérêt diagnostique ou pronostique du proBNP(1-108) sérique n'y est pas démontré. Il n'est pas non plus suggéré qu'il soit possible de doser ce dernier en routine.

Par ailleurs, un certain nombre d'épitopes présents sur le proBNP(1-108) sont connus. C'est ainsi que, dans le cadre de la détection du BNP(77-108), l'épitope de séquence S₇₇PKMVQGSGC₈₆ (SEQ ID N° 105)

correspondant aux 10 acides aminés N-terminaux (AA 1-10) du BNP(77-108) est décrit dans la demande WO 97/32900. Similairement, dans le cadre de la détection du BNP(1-76) (fragment N-terminal du proBNP), l'épitope de séquence R₆₅KMVLYTLRAPR₇₆ (SEQ ID N° 106) correspondant aux 12 acides aminés C-terminaux du BNP(1-76) (fragment N-terminal du proBNP) est décrit dans la demande WO 00/35951, et la séquence voisine H₆₄RKMVLYTLRAPR₇₆ (SEQ ID N° 107) est décrite dans la demande WO 00/45176. Toutefois, aucune de ces demandes de brevet ne décrit ou ne suggère l'existence d'un épitope intermédiaire ou hybride entre ces séquences.

Il existe donc toujours un besoin, dans le cadre du diagnostic précoce de l'insuffisance cardiaque, de disposer d'une méthode qui évite les inconvénients de l'art antérieur. En particulier, il existe un besoin de disposer d'une méthode simple, utilisable en routine et fiable, qui évite les inconvénients de la détection du BNP(77-108), molécule peu abondante et peu stable, tout en évitant les extractions complexes, occasionnées par le dosage d'autres formes moléculaires de BNP, et qui peuvent aller éventuellement jusqu'à requérir une automatisation sophistiquée.

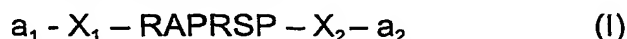
Les auteurs de la présente invention se sont donc attachés à mettre au point une méthode alternative pour résoudre le problème posé. Au cœur de la présente invention se trouve la découverte inattendue, faite par les inventeurs, d'un épitope aux propriétés uniques situé dans le domaine de la séquence charnière Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGSG₈₅ (SEQ ID N° 4) ou de la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄ (SEQ ID N° 108) du proBNP(1-108) et comprenant au minimum la séquence RAPR₇₆S₇₇P (SEQ ID N° 5).

En effet, lors d'une immunisation pratiquée chez le lapin avec un peptide de la région charnière du proBNP(1-108), de séquence CY₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGSG₈₅ (SEQ ID N° 16) ou encore avec le peptide de séquence CY₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄ (SEQ ID N° 109), ils ont découvert de façon surprenante que l'antisérum obtenu non seulement contenait des anticorps qui reconnaissaient de façon spécifique ledit peptide de la région charnière sans substantiellement reconnaître les formes du BNP(1-76) et du BNP(77-108), mais en plus avait la capacité de reconnaître le proBNP(1-108) circulant.

Les auteurs de la présente invention ont, en outre, montré pour la première fois que le proBNP(1-108) circulant était effectivement un marqueur prédictif de l'insuffisance cardiaque et qu'il était présent en concentration significativement plus élevée chez les insuffisants cardiaques que chez des
5 sujets témoins sains.

Les auteurs ont également découvert qu'une autre façon d'obtenir ce type d'anticorps est d'immuniser des animaux à l'aide de la molécule complète de proBNP(1-108). En effet, les auteurs ont trouvé que l'immunisation avec la molécule complète de proBNP(1-108) permettait d'induire l'apparition
10 d'anticorps reconnaissant de façon spécifique une séquence de la région charnière.

De plus, les auteurs de la présente invention ont démontré que l'épitope minimum reconnu par les anticorps selon l'invention avait la séquence suivante : $RAPR_{76}S_{77}P$. Ils ont montré, en outre, qu'une bonne façon d'obtenir
15 les anticorps objets de la présente invention est d'immuniser des animaux avec un peptide de formule générale:



où

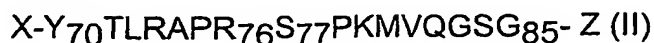
20 a_1 peut être H ou représenter une fonction ou un groupement chimique choisi parmi une fonction thiol, alcool, aminoxy, amine primaire ou secondaire, un groupement amino-carboxyle, un groupement biotinyle et un groupement acétyle,

X_1 représente une séquence peptidique de 0 à 3 acides aminés, issue de la
25 séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

X_2 représente une séquence peptidique de 0 à 8 acides aminés, de préférence 7 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

a_2 peut représenter une fonction OH, NH_2 ou un groupement alcoyle.

De même, les auteurs de la présente invention ont montré qu'il était
30 possible d'obtenir les mêmes anticorps spécifiques par immunisation d'un animal avec un peptide comprenant la séquence $RAPR_{76}S_{77}P$ ou avec un peptide de formule :



où X peut être H ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108).

5 De plus, les auteurs de la présente invention ont montré qu'il était possible d'obtenir les mêmes anticorps spécifiques par immunisation d'un animal avec un peptide de formule :



10 où X peut être H ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108).

15 Les auteurs de la présente invention ont de plus mis au point une méthode simple et fiable de diagnostic précoce de l'insuffisance cardiaque reposant sur la détection du proBNP(1-108) circulant dans le sang et une trousse permettant la mise en œuvre de cette détection du proBNP(1-108) circulant.

20 La présente invention a donc pour objet un anticorps anti proBNP(1-108) caractérisé en ce que, d'une part, il reconnaît de façon spécifique la séquence $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}$ du proBNP(1-108) et ne reconnaît substantiellement pas le BNP(1-76) ni le BNP(77-108), et, d'autre part, a la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains.

25 La présente invention a de plus pour objet un anticorps anti proBNP(1-108) caractérisé en ce que, d'une part, il reconnaît de façon spécifique la séquence $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$ du proBNP(1-108) et ne reconnaît substantiellement pas le BNP(1-76) ni le BNP(77-108), et d'autre part, a la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains.

30 La présente invention a plus particulièrement pour objet un anticorps anti proBNP(1-108) caractérisé en ce que, d'une part, il reconnaît de façon spécifique la séquence $RAPR_{76}S_{77}P$ du proBNP(1-108) et ne reconnaît substantiellement pas le BNP(1-76) ni le BNP(77-108), et, d'autre part, a la

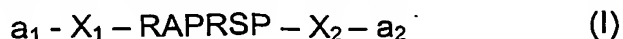
capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains.

La présente invention a en outre pour objet un procédé d'obtention d'anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₅, la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄ et/ou la séquence RAPR₇₆S₇₇P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains caractérisé en ce que l'on immunise un animal avec la molécule entière de proBNP(1-108), puis en ce que l'on épuise, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu.

Par « épuisement d'un antisérum » obtenu contre un antigène spécifique donné (l'antigène immunisant), on entend l'élimination d'anticorps non spécifiques, potentiellement présents dans cet antisérum, par la mise en contact et l'incubation dudit antisérum avec des « antigènes non spécifiques », c'est à dire des antigènes différents de l'antigène immunisant, puis séparation et élimination immunologiques des anticorps ayant réagi avec lesdits « antigènes non spécifiques » et récupération de l'antisérum ainsi épuisé (c'est-à-dire appauvri en anticorps non spécifiques). L'épuisement sert classiquement à rendre spécifique un antisérum dirigé contre un antigène donné.

Dans le présent cas, un antisérum reconnaissant la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₅, et/ou la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄ ou la séquence RAPR₇₆S₇₇P du proBNP(1-108) peut être épuisé, c'est à dire rendu spécifique, par mise en contact avec le BNP(77-108) et/ou le BNP(1-76) susnommés, ces derniers pouvant, par exemple, être immobilisés en phase solide et servir de support à une chromatographie par immunoadsorption selon des techniques conventionnelles, connues de l'homme du métier. L'anticorps présent finalement dans l'antisérum épuisé est ici un anticorps polyclonal monospécifique.

La présente invention a encore pour objet un peptide de formule :



où

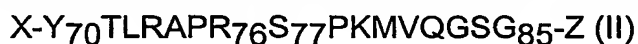
a₁ peut être H ou représenter une fonction ou un groupement chimique choisi parmi une fonction thiol, alcool, aminoxy, amine primaire ou secondaire, un groupement amino-carboxyle, un groupement biotinyle et un groupement acétyle,

X₁ représente une séquence peptidique de 0 à 3 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

X₂ représente une séquence peptidique de 0 à 8 acides aminés, de préférence 7 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

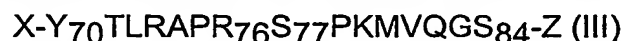
a₂ peut représenter une fonction OH, NH₂ ou un groupement alcoyle.

La présente invention a encore pour objet un peptide de formule :



où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108).

La présente invention a de plus pour objet un peptide de formule :



où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108).

A noter que dans les formules (II) et (III) ci-dessus, le numéro des acides aminés (Y₇₀, R₇₆, S₇₇, S₈₄ ou G₈₅) a été maintenu simplement pour aider à la compréhension de l'invention et au repérage de cette séquence vis-à-vis de la séquence proBNP(1-108). Il en est de même des autres séquences présentées avec des numéros dans cette demande.

L'invention concerne aussi tout peptide contenant la séquence X-Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₅-Z (II) ou la séquence X-Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄-Z (III), ou l'une des séquences (II) ou (III) susdite sous forme substituée, de façon conservatrice ou non, en l'un

quelconque des acides aminés de la position 70 à la position 85 ou 84, respectivement, à condition qu'elle garde intacte (en particulier non substituée) la portion RAPR₇₆S₇₇P.

Il s'agit donc d'un peptide comprenant une séquence dérivée de la séquence X-Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₅-Z (II) ou de la séquence X-Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄-Z (III) par substitution d'un ou plusieurs parmi les acides aminés Y₇₀, T₇₁, L₇₂, K₇₉, M₈₀, V₈₁, Q₈₂, G₈₃, S₈₄ et G₈₅, avec X pouvant être absent ou représenter soit une fonction NH₂, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z pouvant être absent ou représenter soit une fonction OH, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108).

L'invention concerne enfin le peptide de séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₅, et le peptide de séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄.

L'invention a encore pour objet un procédé d'obtention d'anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₅, Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄ et/ou la séquence RAPR₇₆S₇₇P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains caractérisé en ce que l'on immunise un animal avec un peptide de formule :

$$a_1 - X_1 - \text{RAPRSP} - X_2 - a_2 \quad (I)$$

où a₁, X₁, X₂, et a₂ ont la même signification que ci-dessus,

et, éventuellement, en ce que l'on épuise, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu. L'anticorps ainsi obtenu est un anticorps monospécifique.

L'invention a encore pour objet un procédé d'obtention d'anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₅, Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄ et/ou la séquence RAPR₇₆S₇₇P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques

humains caractérisé en ce que l'on immunise un animal avec un peptide de formule :

X-Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₅-Z (II)

ou avec un peptide de formule X-Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄-Z (III),

5 où X et Z sont tels que définis ci-dessus et, éventuellement, en ce que l'on épuise, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu.

L'invention a encore pour objet un procédé d'obtention d'hybridome sécréteur d'anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la
10 séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₅ Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄ et/ou la séquence RAPR₇₆S₇₇P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains caractérisé en ce que l'on immunise un animal avec un
15 peptide de formule :

X-Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₅-Z (II)

ou avec un peptide de formule X-Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄-Z (III),

sous forme substituée, de façon conservatrice ou non, à condition qu'elle garde intacte (en particulier non substituée) la portion RAPR₇₆S₇₇P, où X et Z
20 sont tels que définis ci-dessus et, éventuellement, en ce que l'on épuise, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu.

L'invention a encore pour objet un procédé d'obtention d'anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la séquence
Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₅, Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄ et/ou la
25 séquence RAPR₇₆S₇₇P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle des peptides BNP(1-76) et BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains caractérisé en ce que l'on immunise un animal avec le
peptide de séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₅, ou le peptide de
30 séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄ et, éventuellement, en ce que l'on épuise, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu.

L'invention a encore pour objet un procédé d'obtention d'hybridome

sécréteur d'anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la séquence $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}$, la séquence $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$ et/ou la séquence $RAPR_{76}S_{77}P$ du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains caractérisé en ce que :

- on immunise un animal avec un peptide choisi parmi les peptides de formules suivantes :

$$a_1 - X_1 - RAPRSP - X_2 - a_2 \quad (I)$$

où a_1 , X_1 , X_2 , et a_2 ont la même signification que ci-dessus,

$$X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}-Z \quad (II)$$

où X et Z ont la même signification que ci-dessus,

$$X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}-Z \quad (III)$$

où X et Z ont la même signification que ci-dessus,

$$X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}-Z \quad (II)$$

sous forme substituée, de façon conservatrice ou non, à condition qu'elle garde intacte (en particulier non substituée) la portion $RAPR_{76}S_{77}P$, où X et Z ont la même signification que ci-dessus,

$$X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}-Z \quad (III)$$

sous forme substituée, de façon conservatrice ou non, à condition qu'elle garde intacte (en particulier non substituée) la portion $RAPR_{76}S_{77}P$, où X et Z ont la même signification que ci-dessus,

$$Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}, \text{ et } Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$$

- on prélève des lymphocytes sécréteurs d'immunoglobulines de cet

animal, et en ce que

- on procède à une fusion des lymphocytes avec des cellules de myélome pour obtenir au moins un hybridome sécréteur d'immunoglobulines.

Ceci correspond à la technique classique d'obtention des hybridomes dont le principe est décrit dans Köhler et Milstein, (1975) Nature (London), 256 :495-497.

L'invention a encore pour objet un tel hybridome et l'anticorps anti proBNP(1-108) monoclonal sécrété par ledit hybridome.

La présente invention a en outre pour objet une méthode de diagnostic *in vitro* de l'insuffisance cardiaque chez un humain comprenant la mise en contact d'un échantillon biologique, de préférence de sang, plasma ou sérum, avec un anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₅, la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄ et/ou la séquence RAPR₇₆S₇₇P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains, et la détection du proBNP(1-108) dans l'échantillon.

L'invention fournit de manière générale une méthode de diagnostic *in vitro* de l'insuffisance cardiaque chez un humain comprenant :

a) la mise en contact d'un échantillon biologique, de préférence de sang, plasma ou sérum, avec un anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₅, la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄ et/ou la séquence RAPR₇₆S₇₇P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains,

b) l'incubation du mélange dans des conditions permettant la formation de complexes antigènes-anticorps ; et

c) la révélation des complexes antigènes-anticorps formés, éventuellement à l'aide d'un anticorps de détection, marqué, capable de se lier spécifiquement au proBNP(1-108) présent dans le premier complexe, ou à l'aide d'un antigène de détection, marqué, capable de se lier à l'anticorps dirigé

contre ledit proBNP(1-108) présent dans le premier complexe.

En particulier, l'invention fournit une méthode de diagnostic de l'insuffisance cardiaque qui comprend, en plus des étapes a, b et c susdites, une étape d) de corrélation de la quantité des complexes antigènes-anticorps révélés à l'état clinique du sujet.

La présente invention a de plus pour objet une trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique, notamment dans un échantillon de sang, plasma ou sérum, contenant au moins un anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGSG₈₅, la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄ et/ou la séquence RAPR₇₆S₇₇P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains.

L'invention vise enfin une trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique, notamment dans un échantillon de sang, plasma ou sérum, contenant, comme étalon et/ou témoin, un composé contenant au moins un peptide choisi dans le groupe de peptides de formules suivantes :

$$a_1 - X_1 - \text{RAPRSP} - X_2 - a_2 \quad (I)$$

où a_1 , X_1 , X_2 , et a_2 ont la même signification que ci-dessus,

$$X - Y_{70}\text{TLRAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{PKMVQGSG}_{85} - Z \quad (II)$$

où X et Z ont la même signification que ci-dessus,

$$X - Y_{70}\text{TLRAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{PKMVQGSG}_{85} - Z \quad (II)$$

sous forme substituée, de façon conservatrice ou non, à condition qu'elle garde intacte (en particulier non substituée) la portion RAPR₇₆S₇₇P,

où X et Z ont la même signification que ci-dessus,

$$X - Y_{70}\text{TLRAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{PKMVQGS}_{84} - Z \quad (III),$$

où X et Z ont la même signification que ci-dessus,

X- Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄-Z (III)

sous forme substituée, de façon conservatrice ou non, à condition qu'elle garde intacte (en particulier non substituée) la portion RAPR₇₆S₇₇P, où X et Z ont la même signification que ci-dessus,

Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₅,

Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄.

Définitions

Dans le contexte de l'invention, un « *échantillon biologique* » ou encore un « *échantillon de fluide biologique* » est de préférence constitué par un liquide biologique, tel que du sang, plasma, sérum, de l'urine, du liquide céphalorachidien, de la salive, etc...

Par « insuffisance cardiaque », on entend l'état pathologique dans lequel une anomalie de la fonction cardiaque est responsable de l'incapacité du cœur à pomper le sang de façon suffisante pour répondre aux besoins métaboliques de l'organisme et/ou dans lequel le cœur pourvoit aux besoins mais avec des pressions de remplissage anormalement élevées. Il peut notamment s'agir d'une insuffisance ventriculaire droite et/ou gauche.

Le terme « *anticorps* » se réfère à tout anticorps entier ou fragment fonctionnel d'un anticorps (obtenu par génie génétique ou non), comprenant, ou consistant en, au moins un site de combinaison antigénique, permettant audit anticorps de se lier à au moins un déterminant antigénique d'un composé antigénique. A titre d'exemple de fragments d'anticorps on peut citer les fragments Fab, Fab', F(ab')₂ ainsi que les fragments variables à simple chaîne (chaînes scFv).

Les anticorps anti proBNP(1-108) selon l'invention peuvent être de type polyclonal ou monoclonal. Un anticorps polyclonal anti proBNP(1-108) selon l'invention peut, entre autres, être obtenu par immunisation d'un animal tel qu'un lapin, une souris, etc.. à l'aide du proBNP(1-108) entier, prélèvement puis épuisement de l'antisérum obtenu sur, par exemple, un immunoabsorbant contenant du BNP(77-108) et/ou du BNP(1-76) selon des méthodes en soi connues de l'homme du métier. Un anticorps monoclonal anti proBNP(1-108)

selon l'invention peut, entre autres, être obtenu par la méthode classique de Köhler et Milstein (Nature (London), 256 : 495- 497 (1975)).

La production d'anticorps monoclonaux ou de sérums polyclonaux monospécifiques, ou d'anticorps obtenus par criblage de banques
5 génomiques, utiles dans le cadre de l'invention relève de techniques conventionnelles, qui sont détaillées plus loin.

Par « anticorps de capture », on entend un anticorps ou une partie d'anticorps, de préférence fixé sur une phase solide, qui est capable de retenir l'antigène proBNP(1-108) présent dans un échantillon biologique, par liaison
10 affine.

La présence de l'antigène dans l'échantillon biologique est révélée par des « moyens de détection ». S'agissant de la détection de l'antigène, l'invention prévoit notamment une détection à l'aide d'au moins un « anticorps de détection ». Un tel anticorps de détection, marqué, est capable de se lier à
15 l'antigène capturé, par liaison affine, en reconnaissant un site épitopique, différent de celui reconnu par l'anticorps de capture.

Le terme « marqué » se réfère aussi bien à un marquage direct (par le biais d'enzymes, radioisotopes, fluorochromes, composés luminescents, etc) qu'à un marquage indirect (par exemple, par le biais d'anticorps eux-mêmes
20 marqués de manière directe ou à l'aide de réactifs d'une « paire d'affinité » marquée, telle que, mais non exclusivement, la paire avidine marquée-biotine, etc..).

Par « fragment antigénique », on entend toute partie du proBNP(1-108) capable d'induire la synthèse d'anticorps substantiellement spécifique du seul
25 proBNP(1-108) chez un animal immunisé.

Conformément à la présente invention, un « fragment antigénique » contient au moins le « site épitopique » ou épitope RAPR₇₆S₇₇P. Un « site épitopique » ou « épitope » est une séquence d'acides aminés qui est reconnue par au moins un anticorps et permet la liaison spécifique de celui-ci.

Le terme « anticorps polyclonal monospécifique », s'applique à tout
30 anticorps polyclonal présentant une spécificité pour un seul épitope. Ceci signifie que l'anticorps est capable de lier une séquence d'acides aminés de la séquence du proBNP(1-108) contenant les acides aminés comprenant

l'épitope, mais est incapable de lier une séquence d'acides aminés de la séquence du proBNP(1-108) qui ne contient pas les acides aminés comprenant l'épitope.

Le terme « spécifiquement », quand il se réfère à une reconnaissance ou une liaison spécifique d'un anticorps pour un antigène, signifie que l'anticorps interagit avec l'antigène sans interaction substantielle avec d'autres antigènes, ou si l'on parle de reconnaissance « spécifique » avec un épitope, par reconnaissance quasi-exclusive de cet épitope. Des constantes d'association supérieures à 10^8 L.mol⁻¹ sont préférables.

Par « substitution conservatrice », on entend notamment la substitution d'un acide aminé d'une classe par un acide aminé de la même classe, substitution qui ne modifie pas significativement l'immunoréactivité du peptide obtenu par rapport à celle du peptide d'origine. Parmi les différentes classes d'acides aminés on distingue généralement les acides aminés à chaîne latérale polaire (tel que l'asparagine, la glutamine, la sérine, la thréonine et la tyrosine), les acides aminés à chaîne latérale non polaire (tel que la glycine, l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la phénylalanine, la méthionine, le tryptophane et la cystéine), les acides aminés à chaîne latérale basique (tel que la lysine, l'arginine et l'histidine), et les acides aminés à chaîne latérale acide (tel que l'acide aspartique et l'acide glutamique).

Par « substitution non conservatrice », on entend tout autre type de substitution, qui ne modifie pas significativement l'immunoréactivité du peptide obtenu par rapport à celle du peptide d'origine.

Par l'expression « ne reconnaît substantiellement pas le BNP(1-76) ni le BNP(77-108) », on entend que l'anticorps visé par l'invention présente une réaction croisée avec le BNP(1-76) ou le BNP(77-108) inférieure à 20%, particulièrement inférieure à 10%, de façon préférée inférieure à 5%. La détermination du pourcentage de la réaction croisée se fait selon des méthodes en soi connues de l'homme du métier, par exemple, celle illustrée dans l'exemple 5.

La non-reconnaissance « *substantielle* » des peptides BNP(1-76) et BNP(77-108) correspond de préférence à une absence ou quasi-absence de réaction des anticorps de l'invention avec ces peptides.

Par l'expression « à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108) », on entend que l'anticorps « ne reconnaît substantiellement pas le BNP(1-76) ni le BNP(77-108) » au sens vu plus haut.

Production d'anticorps spécifiques

Les anticorps utilisés dans la présente invention sont des anticorps spécifiques de l'antigène, et, pour cette raison, sont des anticorps monoclonaux ou des anticorps polyclonaux monospécifiques, c'est à dire qu'ils ne reconnaissent spécifiquement qu'un épitope.

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus selon la méthode classique de fusion lymphocytaire et culture d'hybridomes décrite par Köhler et Milstein, Nature, 1975, 256 : 495-497. D'autres méthodes de préparation d'anticorps monoclonaux sont également connues (Harlow et al, ed., 1988 « Antibodies : a laboratory manual »). Les anticorps monoclonaux peuvent être préparés en immunisant un mammifère (par exemple une souris, un rat, un lapin, voire un être humain, etc..) et en utilisant la technique de fusion lymphocytaire conduisant à des hybridomes (Köhler et Milstein, 1975).

Des techniques alternatives à cette technique usuelle existent. On peut, par exemple, produire des anticorps monoclonaux par expression d'un acide nucléique cloné à partir d'un hybridome. On peut également produire des anticorps par la technique d'expression sur phage (« phage display »), en introduisant des ADNc d'anticorps dans des vecteurs, qui sont typiquement des phages filamenteux qui présentent des banques de gènes V à la surface du phage (par exemple fUSE5 pour E. coli, Scott, J.K. et Smith, G.P., Science, 1990, 249 :386-390). Des protocoles de construction de ces banques d'anticorps sont décrits dans Marks et al, 1991, J. Mol. Biol, 222 :581-597).

Les anticorps polyclonaux peuvent être obtenus à partir du sérum d'un animal immunisé contre un antigène de nature peptidique selon les modes opératoires usuels. Les anticorps polyclonaux ainsi obtenus pourront, si besoin est, et par épuisement avec du BNP(77-108) et du BNP1-76, selon des techniques en soit connues de l'homme du métier comme, par exemple, l'immunoabsorption sur colonne, être rendus monospécifiques de la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₅, de la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄

et/ou d'un peptide comprenant la séquence RAPR₇₆S₇₇P, assurant ainsi la spécificité vis à vis du proBNP(1-108), à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108).

5

Anticorps de capture et/ou de détection

En technique sandwich, l'anticorps de capture est choisi de manière à ce qu'il reconnaisse spécifiquement un épitope, sur l'antigène naturel du patient, tandis que l'anticorps de détection est choisi, de préférence, mais non obligatoirement de manière à ce qu'il reconnaisse spécifiquement un autre
10 épitope, sur l'antigène naturel du patient.

L'échantillon biologique peut être éventuellement traité dans une étape préalable, ou mis directement en présence d'au moins un anticorps de capture dans des conditions favorisant l'exposition de l'épitope à détecter.

Le procédé de diagnostic selon l'invention peut être réalisé selon divers
15 formats bien connus de l'homme du métier : en phase solide ou en phase homogène ; en un temps ou en deux temps ; en méthode sandwich ou en méthode compétitive, à titre d'exemples non limitatifs.

Selon un mode de réalisation préféré, l'anticorps de capture est immobilisé sur une phase solide. On peut utiliser, à titre d'exemples non
20 limitatifs de phase solide, des microplaques, en particulier des microplaques de polystyrène, telles que celles commercialisées par la société Nunc, Danemark. On peut également utiliser des particules ou des billes solides, des billes paramagnétiques, telles que celles fournies par Dynal ou Merck-Eurolab (France) (sous la marque EstaporTM), ou encore des tubes à essai en
25 polystyrène ou polypropylène, etc...

Un format d'immunoessai de type sandwich entre deux anticorps (de capture et de détection) est particulièrement avantageux pour la détection des antigènes présents dans l'échantillon biologique.

Un format d'immunoessai de détection des antigènes par compétition
30 est également possible. D'autres modalités d'immunoessais sont encore envisageables et bien connues de l'homme du métier.

Dosages ELISA, radioimmunoessais, ou toute autre technique de détection peuvent être mis en œuvre pour révéler la présence des complexes

antigènes-anticorps formés.

Trousses

Les troupes et réactifs utiles pour la détection du proBNP(1-108) dans un échantillon de fluide biologique, conformément au procédé de l'invention, peuvent être fournis pour une mise en pratique de l'invention facile et applicable à de nombreux échantillons biologiques.

Des troupes de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique peuvent contenir au moins un anticorps tel que défini précédemment. D'autres troupes, contenant comme étalon et/ou témoin, au moins un peptide de formule (I), (II) ou un peptide substitué tel que défini précédemment, peuvent également être utiles à la mise en œuvre de l'invention.

Un autre objet particulier de l'invention est donc une troupe de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon de fluide biologique, comprenant :

- au moins un anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la séquence $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}$, la séquence $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$ et/ou la séquence $RAPR_{76}S_{77}P$ du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains, et qui est de préférence un anticorps de capture dudit proBNP(1-108) présent dans l'échantillon biologique, et

- un conjugué marqué capable de se lier spécifiquement aux complexes antigènes anticorps formés.

Comme cela est décrit ci-dessus, l'anticorps de capture peut être présenté de manière avantageuse sous une forme immobilisée sur une phase solide, telle qu'une microplaque, par exemple, mais non exclusivement.

Une troupe préférée comprend au moins :

- un anticorps de capture anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la séquence $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}$, la séquence $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$, et/ou la séquence $RAPR_{76}S_{77}P$ du proBNP(1-

108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains, ledit anticorps de capture étant immobilisé sur une phase solide ; et

- 5 - un anticorps de détection, marqué, dirigé contre un autre épitope, intact, du proBNP(1-108), ou éventuellement,
- un antigène de détection, marqué, qui est un peptide du proBNP(1-108) ou le proBNP(1-108) lui-même.

10 Selon un mode de réalisation particulier, une trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique, peut contenir :

- dans un récipient, au moins un anticorps tel que défini précédemment ;
- dans un autre récipient au moins un peptide tel que défini précédemment, utile notamment comme étalon et/ou témoin.

15 Les figures et exemples suivants illustrent l'invention sans en limiter la portée.

LEGENDE DES FIGURES :

20 La figure 1 représente la réactivité des anticorps polyclonaux du lapin # 046 805 purifiés sur protéine A-sépharose avec le proBNP (1-108), le fragment BNP(1-76), le BNP(77-108), ou la GST (Glutathion-S-transférase, utilisée comme protéine témoin) adsorbés sur microplaque à 0,25 µg/ml.

25 La figure 2 représente la réactivité des anticorps polyclonaux du filtrat du lapin # 046 805 obtenus après épuisement sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose. Les anticorps polyclonaux sont préparés sous forme de gammes de dilutions de 2 à 20µg/ml, puis testés sur des cupules revêtues de polypeptide proBNP(1-108), BNP(1-76) ou BNP(77-108) adsorbé à 0,25 µg/ml.

30 La figure 3 représente la réactivité des anticorps polyclonaux du filtrat du lapin # 046 832 obtenus après épuisement sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose. Les anticorps polyclonaux sont préparés sous forme de gammes de dilutions de 5 à 20 µg/ml, puis testés sur des cupules revêtues de polypeptide proBNP(1-108), BNP(1-76) ou BNP(77-108) adsorbé à 0,25 µg/ml.

 La figure 4 représente la réactivité de l'éluat du sérum polyclonal du

lapin # 046 805 obtenu après épuisement sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose. Les anticorps polyclonaux sont préparés sous forme de gammes de dilutions de 2 à 20 µg/ml, puis testés sur des cupules revêtues de polypeptide proBNP(1-108), BNP(1-76) ou BNP(77-108) adsorbé à 0,25 µg/ml.

5 La figure 5 représente la réactivité de l'éluat du sérum polyclonal du lapin # 046 832 obtenu après épuisement sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose. Les anticorps polyclonaux sont préparés sous forme de gammes de dilutions de 5 à 20 µg/ml, puis testés sur des cupules revêtues de polypeptide proBNP(1-108), BNP(1-76) ou BNP(77-108) adsorbé à 0,25 µg/ml.

10 La figure 6 représente une analyse épitopique à l'aide de la technique spot du sérum polyclonal du lapin # 046 805 avant épuisement. (Pour cet exemple, le bruit de fond est de $30,4 \pm 5,93$ unités d'intensité relatives.)

La figure 7 représente une analyse épitopique à l'aide de la technique spot du sérum polyclonal du lapin # 046 805 après épuisement sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose. (Pour cet exemple, le bruit de fond est de $31,3 \pm 6,31$ unités d'intensité relatives.)

20 La figure 8 représente la réactivité du surnageant de culture de l'hybridome 3D4 dilué au 1/2, testé sur des cupules revêtues soit de proBNP(1-108), soit de BNP(1-76), soit de BNP(77-108), soit de peptide YTLRAPRSPKMVQGSG (C13P30), adsorbé à 1µg/ml.

25 La figure 9 montre une photographie du gel d'acrylamide à 16% dans lequel on a fait migrer chaque protéine (1µg de protéine par piste). Piste 1 : marqueur de poids moléculaire ; piste 2 : proBNP(1-108)-GST ; piste 3 : GST (protéine témoin négatif); piste 4 : BNP(1-76)-GST ; piste 5 : BNP(77-108).

30 La figure 10 montre les résultats du test en western-blot de l'anticorps produit par l'hybridome 3D4 sur le proBNP(1-108)-GST (piste 2), la GST (protéine témoin négatif) (piste 3), le BNP(1-76)-GST (piste 4), et le BNP(77-108) (piste 5), déposés sur gel (1µg de protéine par gel), puis transférés sur membrane de nitrocellulose.

La figure 11 représente une courbe d'étalonnage du dosage IRMA du proBNP(1-108).

La figure 12 montre les résultats en cpm (coups par minute de

radioactivité) du dosage IRMA du proBNP(1-108) des prélèvements de 14 sujets sains et de 15 patients souffrant d'insuffisance cardiaque.

La figure 13 présente la corrélation entre les concentrations de proBNP(1-108) (en pg/ml) déterminées à l'aide du dosage radioimmunométrique selon l'invention et les concentrations de BNP(1-76) (pg/ml) déterminées, à l'aide du dosage sur l'automate Elecsys® (marque de la société Hoffmann La Roche), des prélèvements de 14 patients souffrant d'insuffisance cardiaque.

La figure 14 représente une courbe d'étalonnage du dosage ELISA du proBNP(1-108) selon l'invention.

La figure 15 représente une évaluation de la réaction croisée, vis à vis du BNP(1-76) et du BNP(77-108), de l'anticorps polyclonal du lapin # 046 805 non épuisé couplé à la biotine, utilisé en sandwich dans le dosage ELISA proBNP(1-108) conjointement à l'anticorps polyclonal anti-BNP(77-108).

La figure 16 représente l'évaluation de la réaction croisée, vis à vis du BNP(1-76) et du BNP(77-108), de l'anticorps polyclonal du lapin # 046 805 non épuisé couplé à la biotine, utilisé en sandwich dans le dosage ELISA proBNP(1-108) conjointement à l'anticorps polyclonal anti-NT-proBNP(1-29).

EXEMPLES

Exemple 1 : synthèse de peptides pour immunisation

Les peptides synthétiques sont produits par les techniques standards bien connues de l'homme du métier. On peut citer, comme exemple, la synthèse de type Merrifield qui est avantageuse vu sa facilité de mise en œuvre (Merrifield, (1963); R.C.Sheppard (1971) ; Atherton et al. (1989)). Comme synthétiseur automatique, on peut utiliser le synthétiseur "9050 Plus Pep Synthesizer" de Millipore, le "Pioneer" de Perspective, ou le synthétiseur "433A" de ABI. Les peptides peuvent également être obtenus par synthèse en phase homogène.

Les synthèses ci-après ont été réalisées sur un synthétiseur Pioneer, en utilisant la chimie « Fmoc » (9-fluorénylméthoxy carbonyl) : à chaque étape les réactifs (c'est à dire l'acide aminé protégé et les activateurs de couplage

(TBTU(2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium tétrafluoroborate)/
HOBt (N-hydroxybenzotriazol)) sont ajoutés en excès (dans un rapport « moles
de réactifs /moles de groupes substituables sur la résine » = 5). A la fin de la
synthèse, le peptide est séparé de la résine par une solution à base d'acide
5 trifluoroacétique (réactif K). Le peptide est ensuite précipité dans une solution
d'éther refroidie, puis purifié par HPLC.

Les inventeurs ont procédé à la synthèse des peptides contenant la
séquence d'acides aminés de la région charnière R₇₆S₇₇ suivants :

10	SEQ ID N° 6 :	C-G-R-A-P-R-S-P	
	SEQ ID N° 7 :	Acetyl -C-G-R-A-P-R-S-P	
	SEQ ID N° 8 :	C-G-R-A-P-R-S-P-K	
	SEQ ID N° 9 :	Acetyl -C-G-R-A-P-R-S-P-K	
	SEQ ID N° 10 :	C-G-R-A-P-R-S-P-K-M-V	
15	SEQ ID N° 11 :	C-G-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G	
	SEQ ID N° 12 :	R-A-P-R-S-P-G-C	
	SEQ ID N° 13 :	Acetyl -R-A-P-R-S-P-G-C	
	SEQ ID N° 14 :	Acetyl -C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K	
	SEQ ID N° 15 :	C-H-R-K-M-V-L-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K	
20	SEQ ID N° 16 :	C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G	(peptide C13P30)
	SEQ ID N° 17 :	C-F-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G	
	SEQ ID N° 18 :	C-F-S-I-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G	
	SEQ ID N° 19 :	C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-βA	
25	SEQ ID N° 20 :	C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-A-T-βA	
	SEQ ID N° 21 :	C-F-S-I-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-A-T-βA	
	SEQ ID N° 22 :	C-F-S-I-R-A-P-R-S-P-A-L-A-S-G-T-A	
	ainsi que		
	SEQ ID N° 109 :	C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S	(peptide CN32)
30	SEQ ID N° 110 :	C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K	
	SEQ ID N° 111 :	C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V	
	SEQ ID N° 112 :	C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q	

SEQ ID N° 113 : C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G
SEQ ID N° 114 : Acétyl-C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q
SEQ ID N° 115 : C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G
SEQ ID N° 116 : C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S
5 SEQ ID N° 117 : C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G
SEQ ID N° 118 : C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V
SEQ ID N° 119 : C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q
SEQ ID N° 120 : L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-C
SEQ ID N° 121 : C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S
10 SEQ ID N° 122 : C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G

NB : β A signifie bêta-alanine.

L'invention a donc aussi pour objet un peptide quelconque choisi dans le groupe constitué par les séquences ci-dessus.

15

Exemple 2 : Couplage d'un peptide à une protéine porteuse pour immunisation

On couple le peptide à une protéine porteuse la KLH (Keyhole Lympet Hemocyanin), La thyroglobuline, la BSA (Bovine Serum Albumin, via
20 différentes fonctions (thiol, amine, aldéhyde...) de façon à rendre le peptide plus immunogène. L'agent de couplage utilisé pour lier le peptide à la protéine peut être hétéro- ou homo-bifonctionnel. Les réactifs les plus couramment utilisés sont le BS 3, le sSMCC, le SPDP, le glutaraldéhyde... L'une des techniques de couplage utilisées est celle qui utilise comme agent chimique de
25 couplage le glutaraldéhyde et comme protéine porteuse la KLH. Le couplage de la KLH sur le peptide est réalisé à partir des fonctions amines du peptide (groupement N-terminal et groupement amine porté par la lysine principalement).

Une solution du peptide C13P30 de séquence YTLRAPRSPKMOVQGS-
30 NH₂ (SEQ ID N° 16) ou de peptide CN32 de séquence YTLRAPRSPKMOVQGS-
NH₂ (SEQ ID N° 109) à 5mg/ml est préparée en tampon PBS Dulbecco NaCl 0,15M à pH 7,4. Un flacon de 20mg de KLH lyophilisée en tampon PBS (Pierce # 77600) est repris par 2ml d'eau PPI (eau pour préparation injectable),

de façon à obtenir une solution de KLH à 10mg/ml en tampon PBS.

1 ml de la solution de peptide (soit 5mg) est mélangée avec 1,25ml de la solution de KLH (soit 12,5mg). Sous hotte aspirante, 2,25ml d'une solution de glutaraldéhyde à 2% préparée extemporanément (à partir de glutaladéhyde à 25%, Sigma # G-5882) sont ajoutés au mélange. Afin d'éviter la formation de complexes de KLH, la solution de glutaraldéhyde à 2% est ajoutée goutte à goutte et sous agitation du mélange. La réaction de conjugaison se fait pendant 2 heures 30 d'incubation à température ambiante. La réaction de couplage est stoppée par ajout d'une solution de borohydrure de sodium à 100 mg/ml de façon à atteindre une concentration finale de 10mg/ml. Le mélange est mis à incuber une nuit à 4°C. Enfin la solution est dialysée sur une nuit à 4°C contre du tampon PBS Dulbecco à pH 7,4. La solution est enfin aliquotée et conservée à -80°C.

Exemple 3 : Immunisations avec des peptides

Pour la production d'anticorps polyclonaux, des lapins (femelles de souche New Zealand) ont été immunisés à l'aide du peptide Cys-YTLRAPRSPKMOVQGS-NH₂ couplé à la KLH selon l'exemple 2. A la première injection, une émulsion de 1,5 ml de peptide couplé à la KLH avec 1,5 ml d'adjuvant de Freund complet (Sigma # F-5881) est réalisée, et 1ml de cette dernière émulsion (soit 200 µg de peptide) est injecté par voie intradermique à chacun des lapins. Deux rappels sont réalisés à 20 jours d'intervalle en injectant par voie intradermique 1ml d'une émulsion de peptide couplé à la KLH (soit 200µg de peptide) avec de l'adjuvant de Freund incomplet (Sigma # F-5506). Vingt jours après le second rappel, un troisième rappel est effectué de la même manière que les précédents rappels mais en injection sous-cutanée. Vingt jours après ce dernier rappel, et après évaluation du titre en anticorps obtenu, les lapins sont saignés. Plus particulièrement les anticorps polyclonaux des lapins identifiés par les numéros # 046 805 et 046 832 obtenus par immunisation avec le peptide C-YTLRAPRSPKMOVQGS-NH₂ (SEQ ID N° 16) couplé à la KLH, et du lapin identifié # L01235, obtenus par immunisation avec le peptide C-YTLRAPRSPKMOVQGS-NH₂ (SEQ ID N°109)

couplé à la KLH, ont été utilisés pour la suite des travaux.

Exemple 4 : obtention et purification des anticorps

Avant purification, les sérums de lapins sont centrifugés 30 minutes à 4
5 500 tours/minute à 4°C. Après décantation, le sérum est dilué de moitié dans
du tampon glycine 1,5M, à pH 8,0 contenant du NaCl 1M.

Exemple 4.a : purification des IgG sur protéine A-sépharose

La purification des anticorps polyclonaux est réalisée par
10 chromatographie d'affinité sur un gel de protéine A-sépharose (Amersham
Biosciences #17.1279.02). La protéine A extraite de *Staphylococcus aureus* se
combine spécifiquement au fragment Fc des molécules d'IgG. Ensuite les IgG,
toutes sous classes confondues, sont éluées à pH 3,0.

Tous les tampons utilisés sont dégazés pendant 15 minutes dans un
15 bain à ultrasons avant passage dans la colonne, afin de prévenir la formation
de bulles.

Une colonne de chromatographie est préparée à l'aide de 12 ml de
protéine A-sépharose. La colonne de gel est équilibrée pendant 40 minutes
avec de l'eau distillée et dégazée, puis pendant 40 minutes avec du tampon
20 PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant du NaCl 0,5 M, et enfin avec du tampon
glycine 1,5 M à pH 8,0 contenant du NaCl 1M, ceci jusqu'à obtention d'une
ligne de base correcte.

Ensuite, 10ml de sérum de lapin dilué de moitié en tampon glycine 1,5
M à pH 8,0 contenant du NaCl 1 M, sont passés dans la colonne à un débit de
25 0,5ml/mn. Après apparition du pic d'albumine, les IgG du sérum sont éluées à
l'aide d'une solution d'acide citrique 0,1M amenée à pH 3,0 avec du tampon
tris sodium de citrate 0,1M. Le pic d'éluion des IgG est récupéré et rapidement
mis en dialyse en tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 une nuit à 4°C. La
concentration des IgG est déterminée après dialyse par lecture de la densité
30 optique à 280 nm contre du tampon PBS.

Après purification sur protéine A, la réactivité des anticorps polyclonaux
est testée en ELISA sur des cupules revêtues soit de proBNP(1-108), soit de
BNP(1-76), soit de BNP(77-108) adsorbé à 0,25 µg/ml. Les résultats obtenus

pour les anticorps polyclonaux du lapin # 046 805 sont présentés dans la figure 1. Les anticorps polyclonaux du lapin # 046 832 ont donné des résultats identiques. Les anticorps polyclonaux des lapins # 046 805 et # 046 832 sont relativement spécifiques du proBNP(1-108). Nous avons cependant pu noter la présence d'une faible réactivité anti-BNP(77-108) à des concentrations élevées, réactivité que nous avons pu supprimer en rendant les anticorps polyclonaux de ces lapins monospécifiques par épuisement sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose, selon le procédé décrit dans l'exemple 4.b.

Exemple 4.b : Epuisement des IgG sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose

Le but de cette opération est d'éliminer la réactivité croisée observée vis à vis du BNP(77-108).

La réactivité croisée de l'anticorps polyclonal obtenue étant localisée en position N-terminale de la molécule de BNP(77-108), il était important de bien présenter cette région du BNP(77-108) aux immunoglobulines à éliminer. A ces fins, le BNP(77-108) a été synthétisé avec une extension de 3 résidus de lysine en position C-terminale (BNP-K₃) afin de favoriser son couplage à la résine NHS-sépharose par son extrémité C-terminale.

Le BNP-K₃ : S-P-K-M-V-Q-G-S-G-C-F-G-R-K-M-D-R-I-S-S-S-S-G-L-G-C-K-V-L-R-R-H-K-K-K (SEQ ID n° 104) a été synthétisé sur un synthétiseur Pioneer, en utilisant la chimie « Fmoc » (9-fluorénylméthoxy carbonyl) citée ci-dessus sous l'exemple 1.

5 mg de BNP-K₃ sont dissous à l'aide du tampon NaHCO₃ 100mM, à pH 8,3 additionné de NaCl 0,5M à une concentration de 10mg/ml. 2ml de résine NHS-sépharose (NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, Amersham Biosciences # 17.0906.01) sont centrifugés 30 secondes à 1000 tours/mn à 4°C. La résine est lavée avec 15ml d'une solution d'HCl 1mM froid. Après centrifugation et élimination de la solution d'HCl, la résine est mélangée au ligand BNP-K₃ à 10mg/ml. Le mélange est mis à incuber 1 heure à température ambiante sous agitation lente. Après centrifugation et élimination de la solution de ligand, les groupements non réactifs de la résine sont bloqués à l'aide de 5ml de tampon glycine 0,1M, à pH 8,0. Le mélange est mis à incuber 1 heure à température ambiante sous agitation lente. Après

centrifugation et élimination du tampon de blocage, la résine est reprise par 5 ml de tampon NaHCO₃ 100mM, à pH 8,3 additionné de NaCl 0,5M. Quatre lavages à l'aide de ce tampon sont réalisés. Au dernier lavage, le mélange est déposé sur une colonne de chromatographie.

5 Après préparation de la colonne de chromatographie, 10mg d'IgG du lapin # 046 805 ou du lapin # 046 832 sont déposés sur la colonne. Une pompe péristaltique reliée à la colonne permet de faire circuler les IgG du sérum de lapin toute une nuit à 4°C. Le lendemain, la solution d'IgG est récupérée (= filtrat). La fraction d'IgG liée sur le BNP-K₃ est éluée (= éluat) à l'aide du
10 tampon Tris 20mM, à pH 8,0 contenant de l'urée 5M. On teste ensuite l'éluat et le filtrat afin de s'assurer de l'efficacité de l'épuisement. Les figures 2 et 3 montrent les résultats des tests réalisés en ELISA avec le filtrat des sérums polyclonaux des lapins # 046 805 et # 046 832, respectivement. Les figures 4 et 5 montrent les résultats des tests réalisés en ELISA avec l'éluat des sérums
15 polyclonaux des lapins # 046 805 et # 046 832, respectivement.

Comme c'était attendu, le filtrat des sérums polyclonaux des lapins # 046 805 et # 046 832 est spécifique du proBNP(1-108) : aucune réactivité n'est observée sur le BNP(1-76) ni sur le BNP(77-108). L'éluat conserve une réactivité vis à vis du proBNP(1-108) importante, mais également une réactivité
20 vis à vis du BNP(77-108). Ces résultats confirment l'efficacité de l'épuisement du sérum polyclonal du lapin sur la résine BNP-K₃-NHS-sépharose.

Le BNP(77-108) provient de Sigma (# B-5900), tandis que le proBNP(1-108) et le BNP(1-76) ont été produits sous forme de protéines recombinées exprimées après clonage dans le vecteur pGEX-2T (Amersham
25 Pharmacia Biotech) et transfection chez E coli, par les techniques classiques bien connues de l'homme du métier. Le vecteur d'origine a été fourni par la société Berlex Biosciences (Richmond, CA, USA) et sa préparation est décrite par Yan et al. (PNAS, 2000, vol. 97, pp. 8525-8529). La concentration du proBNP(1-108) et celle du BNP(1-76) ont été déterminées par la méthode
30 Bradford de dosage colorimétrique des protéines (Bradford M. Anal. Biochem. 1976; 72:248-54).

Exemple 5 : Détermination du pourcentage de réaction croisée des anticorps anti proBNP(1-108) des lapins # 046 805 et # L01235 vis à vis du BNP(1-76) et du BNP(77-108)

Matériels :

5 1) Phase solide : microplaque Maxisorp à fond plat, Nunc (Danemark).
 2) Le BNP(77-108) provient de Sigma (# B-5900), tandis que le proBNP(1-108) et le BNP(1-76) ont été produits sous forme de protéines recombinées. La concentration de ces solutions de protéines a été déterminée par la méthode Bradford de dosage colorimétrique des protéines (Bradford M.
10 Anal. Biochem. 1976;72:248-54).

 3) Le conjugué utilisé est un anticorps polyclonal anti-IgG de lapin couplé à la peroxidase (Sigma # A-9169)

 4) Tampon de saturation : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 1% d'albumine bovine sérique (BSA, Sigma #A-7888)

15 5) Tampon de dilution : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de BSA et 0,1% de Tween 20.

 6) Solution de lavage : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de Tween 20.

 7) Solution de révélation: la solution de révélation est composée :

20 7a) d'un tampon substrat : Solution d'acide citrique 0,01M, et de citrate trisodique 0,04M contenant de l'H₂O₂ à 0,33%, de pH final 5,6, et

 7b) d'un chromogène : comprimés d'OPD (orthophénylènediamine). 1 comprimé d'OPD à dissoudre dans 10ml de tampon substrat.

 8) Solution d'arrêt : H₂SO₄ 4N.

25 *Protocole :*

 Le test consiste à évaluer l'immunoréactivité des anticorps polyclonaux directement sur les différentes protéines immobilisées dans les cupules d'une plaque de microtitrage.

30 ✓ Plusieurs solutions de sensibilisation en tampon PBS Dulbecco pH 7,4 sont tout d'abord préparées : une première contenant du BNP(77-108) à 0,25µg/ml, une deuxième contenant du proBNP(1-108) à 0,25µg/ml, une

troisième contenant du BNP(1-76) à 0,25µg/ml, et une quatrième contenant de la GST (protéine témoin bruit de fond) à 0,25µg/ml.

✓ 100µl de chacune de ces solutions sont déposés séparément dans les puits d'une microplaque.

5 ✓ La microplaque est mise à incuber pendant une nuit à 4°C.

✓ Après élimination de la solution de sensibilisation, la microplaque est lavée à l'aide de 300 µl d'un tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de Tween 20, puis saturée par addition de 250µl du tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 1% de BSA.

10 ✓ La microplaque est alors mise à incuber pendant 1 heure à 37°C.

✓ La microplaque est ensuite lavée (3 fois) à l'aide de la solution de lavage.

✓ Dans chaque cupule, 100µl de solution d'anticorps polyclonal, préalablement dilué à 2 et 1µg/ml pour le sérum polyclonal du lapin # 046 805
15 et au 1/2500 et 1/5000 pour le sérum polyclonal du lapin # L01235, sont déposés.

✓ Le milieu réactionnel est mis à incuber 2 heures à température ambiante

✓ La microplaque est ensuite lavée 3 fois avec 300µl de la solution de
20 lavage.

✓ 100µl du conjugué anticorps polyclonal anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase, dilué au 1/8000 en tampon de dilution, sont ajoutés dans chaque puits de la microplaque.

✓ Le milieu réactionnel est mis à incuber pendant 1 heure à
25 température ambiante.

✓ Les plaques sont ensuite lavées (5 lavages) avec 300µl de la solution de lavage. Dans chaque cupule, 100 µl de la solution de révélation sont distribués. On laisse la réaction se développer à l'obscurité pendant 20 minutes à température ambiante (18-24°C).

30 ✓ Ensuite 50 µl de la solution d'arrêt sont distribués dans chaque cupule.

✓ Après arrêt de la réaction, la lecture de la densité optique est effectuée au spectrophotomètre à 490/620 nm.

Tableau 1: Résultats de la détermination du pourcentage de réaction croisée des anticorps polyclonaux des lapins #046 805, et #L01235 vis à vis du BNP(1-76) et du BNP(77-108)

Pour un anticorps anti proBNP(1-108) donné, testé sur le BNP(77-108) adsorbé à 0,25µg/ml, sur le proBNP(1-108) adsorbé à 0,25µg/ml et sur la GST adsorbée à 0,25µg/ml, on calcule le pourcentage de la réaction croisée de l'anticorps avec le BNP(77-108) à l'aide de la formule suivante:

$$\% = \frac{DO_{(BNP77-108)} - DO_{(GST)}}{DO_{(proBNP1-108)} - DO_{(GST)}} \times 100$$

Pour un anticorps anti proBNP(1-108) donné, testé sur le BNP(1-76) adsorbé à 0,25µg/ml, sur le proBNP(1-108) adsorbé à 0,25µg/ml et sur la GST adsorbée à 0,25µg/ml, on calcule le pourcentage de la réaction croisée de l'anticorps avec le BNP(1-76) à l'aide de la formule suivante :

$$\% = \frac{DO_{(BNP1-76)} - DO_{(GST)}}{DO_{(proBNP1-108)} - DO_{(GST)}} \times 100$$

	% réaction croisée			
	sérum polyclonal #046 805 à 1µg/ml	sérum polyclonal #046 805 à 2 µg/ml	sérum polyclonal #L01235 1/5000	sérum polyclonal #L01235 1/2500
BNP(77-108) à 0,25µg/ml	1,44%	2,13%	3,55 %	4,3%
BNP(1-76) à 0,25µg/ml	1,00%	1,29%	0,21%	0,00%

Conclusion : La réaction croisée des anticorps polyclonaux de ces sérums est inférieure à 2% sur le BNP(1-76) et inférieure à 5% sur le BNP(77-108). La réactivité croisée vis à vis du BNP(77-108) peut être éliminée par le procédé

d'épuisement décrit dans l'exemple 4.b. Cependant, comme c'est décrit dans les exemples 19 et 20, dans les conditions d'un dosage immunoenzymométrique du proBNP(1-108), et aux concentrations de BNP(77-108) et de BNP(1-76) habituellement retrouvées chez les patients, ces anticorps polyclonaux peuvent être utilisés dans leur version non épuisée sans entraîner l'apparition de réaction croisée.

Exemple 6 : identification de l'épitope reconnu par les sérums polyclonaux des lapins #046 805 et #046 832 avant et après épuisement sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose

Les sérums polyclonaux des lapins # 046 805 et # 046 832 avant et après épuisement sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose ont été testés par la méthode spot afin d'identifier l'épitope reconnu par ces sérums polyclonaux. Cette méthode, décrite par Frank (Tetrahedron, 1992; 48:9217-32), permet la synthèse rapide sur membrane de nitrocellulose d'un grand nombre de peptides de séquences prédéfinies. Les protocoles utilisés sont ceux décrits par Molina et al. (Pept. Res., 1996; 9:151-5). Sur une feuille de papier sont créées des zones circulaires (spots) d'environ 5 mm de diamètre, comportant une fonction aminée, qui servent de point d'ancrage à l'acide aminé C-terminal du peptide synthétique. L'allongement de la chaîne peptidique s'effectue par additions successives de Fmoc-acides aminés activés. Les chaînes latérales des acides aminés sont bloquées par des groupements chimiques adéquats. Tous les peptides sont synthétisés avec leur résidu N-terminal N-acétylé. A l'issue de la synthèse, les chaînes latérales sont déprotégées par action de l'acide trifluoroacétique. Ce traitement n'affecte pas la liaison entre le peptide et le support cellulosique, et la réactivité des peptides peut être évaluée par un essai colorimétrique.

La série de peptides synthétisés sur membrane est constituée de 32 pentadécapeptides décalés de 3 résidus d'acides aminés représentant la totalité de la séquence du proBNP(1-108).

Tableau II : Membrane spot constituée de 32 pentadécapeptides décalés de 3 en 3 résidus d'acides aminés représentant la totalité de la séquence du proBNP(1-108).

Séquence	N° spot	Séquence	N° spot
HPLGSPGSASDLETS (SEQ ID n° 23)	1	GVWKSREVATEGIRG (SEQ ID n° 39)	17
GSPGSASDLETSGLQ (SEQ ID n° 24)	2	KSREVATEGIRGHRK (SEQ ID n° 40)	18
GSASDLETSGLQEQR (SEQ ID n° 25)	3	EVATEGIRGHRKMVL (SEQ ID n° 41)	19
SDLETSGLQEQRNHL (SEQ ID n° 26)	4	TEGIRGHRKMVLYTL (SEQ ID n° 42)	20
ETSGLQEQRNHLQGK (SEQ ID n° 27)	5	IRGHRKMVLYTLRAP (SEQ ID n° 43)	21
GLQEQRNHLQGKLSE (SEQ ID n° 28)	6	HRKMVLYTLRAPRSP (SEQ ID n° 44)	22
EQRNHLQGKLSELQV (SEQ ID n° 29)	7	MVLYTLRAPRSPKMOV (SEQ ID n° 45)	23
NHLQGKLSELQVEQT (SEQ ID n° 30)	8	YTLRAPRSPKMOVQGS (SEQ ID n° 46)	24
QGKLSELQVEQTSLE (SEQ ID n° 31)	9	RAPRSPKMOVQGSGCF (SEQ ID n° 47)	25
LSELQVEQTSLEPLQ (SEQ ID n° 32)	10	RSPKMOVQGSGCFGRK (SEQ ID n° 48)	26
LQVEQTSLEPLQESP (SEQ ID n° 33)	11	KMOVQGSGCFGRKMDR (SEQ ID n° 49)	27
EQTSLEPLQESPRPT (SEQ ID n° 34)	12	QGSGCFGRKMDRISS (SEQ ID n° 50)	28
SLEPLQESPRPTGVW (SEQ ID n° 35)	13	GCFGRKMDRISSSSG (SEQ ID n° 51)	29
PLQESPRPTGVWKS (SEQ ID n° 36)	14	GRKMDRISSSSGLGC (SEQ ID n° 52)	30
ESPRPTGVWKSREVA (SEQ ID n° 37)	15	MDRISSSSGLGCKVL (SEQ ID n° 53)	31
RPTGVWKSREVATEG (SEQ ID n° 38)	16	ISSSSGLGCKVLRH (SEQ ID n° 54)	32

Après saturation de la membrane à l'aide de 30 ml du tampon TBS (Tris Buffer Saline) à pH 7,0 additionné de Tween 20 à 0,1%, de Blocking buffer à 5% (Euromedex # SU-07-250), et de saccharose à 5%, la réactivité de 20 ml du sérum polyclonal de lapin dilué à 10µg/ml est testée (sur une incubation de 1 heure 30 minutes à 37°C sous agitation). Après lavage avec le tampon TBS à pH 7,0 additionné de Tween 20 à 0,1%, 20 ml de conjugué anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline (Sigma # A-8025) sont mis à incuber 1 heure à température ambiante sous agitation. Enfin, après une dernière série de lavages avec 30 ml de solution de lavage, la révélation des spots est réalisée par addition de 30 ml de solution de substrat (solution de 30ml de tampon CBS (Citrates Buffer Saline) à pH 7,0 contenant 120µl de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-Indolyl phosphate) 0,15M, 150µl de MgCl₂ 1M et 180µl de MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide) 0,1M. Après scanérisation de la membrane, l'intensité des spots de la membrane est évaluée (en unités d'intensité relatives) à l'aide d'un logiciel de traitement d'image. Le bruit de fond est calculé à partir des spots non détectés par l'antisérum. Les résultats de l'analyse épitopique du sérum polyclonal du lapin # 046 805 avant épuisement sont présentés dans la figure 6. Cinq peptides (spots 22 à 26) sont détectés par le sérum polyclonal, et la séquence commune à ces cinq peptides est R₇₆S₇₇P. Cependant, la réactivité est nettement augmentée lorsque le motif RAP se rajoute en position N-terminale du motif R₇₆S₇₇P. Les résultats de l'analyse épitopique du sérum polyclonal du lapin # 046 805 après épuisement sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose sont présentés dans la figure 7. Quatre peptides (spots 22 à 25) sont détectés par le sérum polyclonal, et la séquence commune à ces 4 peptides est RAPR₇₆S₇₇P. Contrairement à ce qui est observé pour le sérum polyclonal avant épuisement, aucune réactivité sur le motif R₇₆S₇₇P seul n'est observé (spot 26). Ceci explique qu'après épuisement sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose, le sérum polyclonal ne détecte plus le BNP(77-108) [pour rappel, le motif S₇₇P correspond aux deux premiers acides aminés de la séquence du BNP(77-108)]. En conclusion l'épitope reconnu par le sérum polyclonal du lapin # 046 805 rendu monospécifique est RAPR₇₆S₇₇P.

Des résultats tout à fait identiques ont été obtenus à l'aide du sérum polyclonal du lapin # 046 832 : l'épitope reconnu par le sérum polyclonal de ce

lapin rendu monospécifique est également RAPR₇₆S₇₇P.

Exemple 7 : identification de l'épitope minimum des sérums polyclonaux des lapins # 046 805 et # 046 832 avant et après épuisement, par la méthode de l'Ala-scan

Les sérums polyclonaux des lapins # 046 805 et # 046 832, avant et après épuisement sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose, ont été testés par la méthode spot (décrite dans l'exemple 6) afin d'identifier l'épitope minimum, dans le peptide charnière, permettant la reconnaissance spécifique du seul proBNP(1-108) par les sérums polyclonaux. On a synthétisé une membrane constituée de 16 pentadécapeptides reprenant la séquence du peptide charnière YTLRAPRSPKMVQGS et porteurs d'une substitution de proche en proche d'un acide aminé par un résidu alanine (Alanine-scanning ou « Ala-scan ») ou glycine, substitution à chaque fois décalée vers la droite d'un résidu d'acide aminé (tableau III). Les résultats de l'analyse Ala-scan des sérums polyclonaux des lapins # 046 805 et # 046 832 avant et après épuisement sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose sont présentés dans le tableau III.

Tableau III : membrane spot à 16 pentadécapeptides YTLRAPRSPKMVQGS porteurs d'une substitution de proche en proche de chaque acide aminé par un résidu alanine ou glycine. Réactivité des sérums polyclonaux des lapins # 046 805 et # 046 832 avant et après épuisement sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose.

SEQ ID	Séquence	N° spot	Réactivité (en unités d'intensité relatives) sérum polyclonal lapin # 046 805	Réactivité (en unités d'intensité relatives) sérum polyclonal lapin # 046 805 épuisé	Réactivité (en unités d'intensité relatives) sérum polyclonal lapin# 046 832 non épuisé	Réactivité (en unités d'intensité relatives) sérum polyclonal lapin # 046 832 épuisé

			non épuisé			
SEQ ID n° 46	YTLRAPRSPK <u>M</u> V QGS	716	84	69	151	132
SEQ ID n° 55	A <u>T</u> LRAPRSPK <u>M</u> V QGS	717	90	68	148	130
SEQ ID n° 56	YALRAPRSPK <u>M</u> V QGS	718	101	71	154	130
SEQ ID n° 57	YTARAPRSPK <u>M</u> V QGS	719	108	77	152	133
SEQ ID n° 58	YTLA <u>A</u> PRSPK <u>M</u> V QGS	720	101	<u>39</u>	148	<u>106</u>
SEQ ID n° 59	YTLR <u>G</u> PRSPK <u>M</u> V QGS	721	93	<u>39</u>	156	132
SEQ ID n° 60	YTLRA <u>A</u> RSPK <u>M</u> V QGS	722	103	96	137	<u>48</u>
SEQ ID n° 61	YTLRAPA <u>S</u> PK <u>M</u> V QGS	723	<u>50</u>	<u>23</u>	150	<u>116</u>
SEQ ID n° 62	YTLRAPRA <u>P</u> K <u>M</u> V QGS	724	<u>58</u>	<u>44</u>	148	<u>113</u>
SEQ ID n° 63	YTLRAPRS <u>A</u> K <u>M</u> V QGS	725	<u>74</u>	<u>41</u>	<u>85</u>	<u>67</u>
SEQ ID n° 64	YTLRAPRSP <u>A</u> <u>M</u> V QGS	726	138	118	157	148
SEQ ID n° 65	YTLRAPRSPK <u>A</u> V QGS	727	98	77	150	130
SEQ ID n° 66	YTLRAPRSPK <u>M</u> <u>A</u> QGS	728	100	68	138	130
SEQ ID n° 67	YTLRAPRSPK <u>M</u> V <u>A</u> GS	729	95	71	142	133
SEQ ID n° 68	YTLRAPRSPK <u>M</u> V Q <u>A</u> S	730	107	78	143	134
SEQ ID n° 69	YTLRAPRSPK <u>M</u> V Q <u>G</u> <u>A</u>	731	112	68	153	132

NB : les résidus alanine ou glycine substitués aux acides aminés initiaux sont soulignés (A et G).

Les acides aminés critiques dans la reconnaissance de l'épitope reconnu par le sérum polyclonal du lapin # 046 805 avant épuisement sont R₇₆S₇₇P, tandis qu'après épuisement du sérum polyclonal du lapin # 046 805 sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose, outre le motif R₇₆S₇₇P, le motif RA devient contributeur. Pour le sérum polyclonal du lapin # 046 832 avant épuisement, seule la proline P₇₈ est contributrice, tandis qu'après épuisement du sérum polyclonal du lapin # 046 832 sur résine BNP-K₃-NHS-sépharose, le motif contributeur est R-PR₇₆S₇₇P. Ces résultats montrent donc que l'épitope minimum obligatoire dans la reconnaissance spécifique du proBNP(1-108) par les anticorps polyclonaux des lapins # 046 805 et #046 832 est RAPR₇₆S₇₇P.

Exemple 8 : identification de l'épitope minimum du sérum polyclonal du lapin #L01235, par la méthode de l'Ala-scan

Le sérum polyclonal du lapin # L01235, spécifique d'emblée du proBNP(1-108) (épuisement inutile), a été testé par la méthode spot (décrite dans l'exemple 6) afin d'identifier l'épitope minimum, dans le peptide charnière, permettant la reconnaissance spécifique du seul proBNP(1-108) par le sérum polyclonal. La membrane utilisée est celle décrite dans l'exemple 7. Les résultats de l'analyse Ala-scan du sérum polyclonal du lapin # L01235 sont présentés dans le tableau IV.

Tableau IV : membrane spot à 16 pentadécapeptides YTLRAPRSPKMVQGS porteurs d'une substitution de proche en proche de chaque acide aminé par un résidu alanine ou glycine. Réactivité du sérum polyclonal du lapin # L01235.

SEQ ID	Séquence	Réactivité (en unités d'intensité relatives) sérum polyclonal du lapin # L01235
SEQ ID n° 46	YTLRAPRSPKMVQGS	94
SEQ ID n° 55	<u>A</u> TLRAPRSPKMVQGS	91
SEQ ID n° 56	Y <u>A</u> LRAPRSPKMVQGS	84
SEQ ID n° 57	YT <u>A</u> RAPRSPKMVQGS	92

SEQ ID n° 58	YTL <u>A</u> APRSPKMOVQGS	<u>66</u>
SEQ ID n° 59	YTLR <u>G</u> PRSPKMOVQGS	71
SEQ ID n° 60	YTLRA <u>A</u> RSPKMOVQGS	<u>67</u>
SEQ ID n° 61	YTLRAP <u>A</u> SPKMOVQGS	71
SEQ ID n° 62	YTLRAPR <u>A</u> PKMOVQGS	<u>47</u>
SEQ ID n° 63	YTLRAPRS <u>A</u> KMOVQGS	<u>53</u>
SEQ ID n° 64	YTLRAPRSP <u>A</u> MOVQGS	102
SEQ ID n° 65	YTLRAPRSPK <u>A</u> VQGS	73
SEQ ID n° 66	YTLRAPRSPKMA <u>Q</u> GS	70
SEQ ID n° 67	YTLRAPRSPKMOV <u>A</u> GS	70
SEQ ID n° 68	YTLRAPRSPKMOVQ <u>A</u> S	83
SEQ ID n° 69	YTLRAPRSPKMOVQGA <u>A</u>	80

NB : les résidus alanine ou glycine substitués aux acides aminés initiaux sont soulignés (A et G).

5 Comme pour les sérums polyclonaux des lapins # 046 805 et # 046 832 (exemple 7), ces résultats montrent que l'épitope minimum obligatoire dans la reconnaissance spécifique du proBNP(1-108) par les anticorps polyclonaux du lapin # L01235 est RAPR₇₆S₇₇P.

10 **Exemple 9 : Immunisation de souris avec la protéine recombinée proBNP(1-108)**

On a immunisé des souris de souche BALB/c (femelles âgées de 6 semaines) à l'aide du proBNP(1-108) recombiné décrit dans l'exemple 4.b, par les techniques classiques bien connues de l'homme du métier. A la
15 première injection, une émulsion de 1 ml de proBNP(1-108) avec 1ml d'adjuvant de Freund complet (Sigma # F-5881) est réalisée, et 300µl de cette émulsion (soit 100µg de protéine) sont injectés par voie sous-cutanée à chacune des souris. Deux rappels sont réalisés à 15 jours d'intervalle par injection par voie intrapéritonéale de 300µl d'une émulsion de proBNP(1-108)
20 (soit 100µg de protéine) avec de l'adjuvant de Freund incomplet (Sigma # F-5506). Quinze jours après le second rappel, un troisième rappel est effectué de la même manière que les précédents rappels mais en injection

sous-cutanée. Enfin, 15 jours après ce dernier rappel, on réalise des prélèvements sanguins sur les souris pour analyser la réponse immunitaire par la technique spot. La réponse immunitaire de la souris 12 s'est avérée particulièrement intéressante pour la suite des travaux.

5

Exemple 10 : Identification des épitopes reconnus par les anticorps polyclonaux de la souris 12 sur la séquence du proBNP(1-108)

La méthode spot utilisée pour identifier les épitopes reconnus par les anticorps polyclonaux de la souris 12 sur la séquence du proBNP(1-108) est décrite dans l'exemple 6.

La série de peptides synthétisés sur membrane est constituée de 94 pentadécapeptides, décalés chacun d'un résidu d'acide aminé, représentant la totalité de la séquence du proBNP(1-108). La réactivité du sérum polyclonal de la souris 12 dilué au 1/500ème est testée sur cette membrane comme c'est décrit dans l'exemple 6. Après scanérisation de la membrane, l'intensité des spots de la membrane est évaluée (en unités d'intensité relatives) à l'aide d'un logiciel de traitement d'image. Le bruit de fond, calculé à partir des spots non détectés par l'antisérum, était de 30 unités d'intensité relatives.

Trois régions situées en position N-terminale de la séquence du proBNP(1-108) sont ainsi particulièrement bien détectées par les anticorps de l'antisérum de la souris 12 : séquence H₁PLGSPGSASDLETS₁₅ (SEQ ID N° 23) (spots 1 à 12), séquence L₁₇QEQRNHLQGK₂₇ (SEQ ID N° 123) (spots 17 à 27) et séquence L₃₈EPLQESPRPTG₄₉ (SEQ ID N° 124) (spots 38 à 49).

De façon surprenante, l'antisérum de la souris 12 contient également des anticorps capables de reconnaître des spots dont la séquence peptidique comprend le motif RAPR₇₆S₇₇P : spots 64 à 68. Les séquences peptidiques des spots sont décrites dans le tableau V.

30

Tableau V : Epitopes de la région charnière reconnus, à l'aide de la technique spot, par l'antisérum de la souris 12.

N° spot	séquence peptidique du spot détecté	réactivité en unités relatives d'intensité	N° spot	séquence peptidique du spot détecté	réactivité en unités relatives d'intensité
1	HPLGSPGSASDLETS (SEQ ID n° 23)	177,0	38	LEPLQESPRPTGVWK (SEQ ID n° 88)	177,0
2	PLGSPGSASDLETSG (SEQ ID n° 70)	170,0	39	EPLQESPRPTGVWKS (SEQ ID n° 89)	188,0
3	LGSPGSASDLETSGL (SEQ ID n° 71)	145,7	40	PLQESPRPTGVWKS (SEQ ID n° 90)	109,0
4	GSPGSASDLETSGLQ (SEQ ID n° 24)	166,3	41	LQESPRPTGVWKSRE (SEQ ID n° 91)	166,0
5	SPGSASDLETSGLQE (SEQ ID n° 72)	185,0	42	QESPRPTGVWKSREV (SEQ ID n° 92)	164,0
6	PGSASDLETSGLQEQ (SEQ ID n° 73)	169,3	43	ESPRPTGVWKSREVA (SEQ ID n° 93)	147,0
7	GSASDLETSGLQEQR (SEQ ID n° 25)	155,2	44	ESPRPTGVWKSREVA (SEQ ID n° 93)	149,0
8	SASDLETSGLQEQRN (SEQ ID n° 74)	176,5	45	SPRPTGVWKSREVA (SEQ ID n° 94)	175,0
9	ASDLETSGLQEQRNH (SEQ ID n° 75)	108,0	46	PRPTGVWKSREVATE (SEQ ID n° 95)	186,0
10	SDLETSGLQEQRNHL (SEQ ID n° 76)	118,3	47	RPTGVWKSREVATEG (SEQ ID n° 16)	171,0
11	DLETSGLQEQRNHLQ (SEQ ID n° 77)	121,0	48	PTGVWKSREVATEGI (SEQ ID n° 96)	148,0
12	LETSGLQEQRNHLQG (SEQ ID n° 78)	101,0	49	TGVWKSREVATEGIR (SEQ ID n° 97)	72,0
17	LQEQRNHLQGKLSSEL (SEQ ID n° 79)	99,0	61	IRGHRKMVLYTLRAP (SEQ ID n° 98)	105,8
18	QEQRNHLQGKLSSELQ (SEQ ID n° 80)	179,8	62	RGHRKMVLYTLRAPR (SEQ ID n° 99)	97,7
19	EQRNHLQGKLSSELQV (SEQ ID n° 29)	189,6	63	GHRKMVLYTLRAPRS (SEQ ID n° 100)	95,9
20	QRNHLQGKLSSELQVE (SEQ ID n° 81)	211,8	64	HRKMVLYTLRAPRSP (SEQ ID n° 53)	92,8
21	RNHLQGKLSSELQVEQ	219,0	65	RKMVLYTLRAPRSPK (SEQ	48,0

	(SEQ ID n° 82)			ID n° 101)	
22	NHLQGKLSLQVEQT (SEQ ID n° 30)	213,3	66	KMVLYTLRAPRSPKM (SEQ ID n° 102)	48,0
23	HLQGKLSLQVEQTS (SEQ ID n° 83)	202,6	67	MVLYTLRAPRSPKMV (SEQ ID n° 45)	42,1
24	LQGKLSLQVEQTSL (SEQ ID n° 84)	189,5	68	VLYTLRAPRSPKMVQ (SEQ ID n° 103)	38,4
25	QGKLSLQVEQTSLE (SEQ ID n° 85)	187,3			
26	GKLSLQVEQTSLEP (SEQ ID n° 86)	36,6			
27	KLSLQVEQTSLEPL (SEQ ID n° 87)	69,9			

Exemple 11 : Obtention d'anticorps monoclonaux reconnaissant de façon spécifique le proBNP(1-108), à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108)

La souris (femelle BALB/c de 5 semaines) sélectionnée pour la production d'anticorps monoclonaux a été immunisée avec le peptide SEQ ID N° 16 C-YTLRAPRSPKMVQGSG-NH₂ (C13P30) couplé à la KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) selon le protocole suivant : 100µg du peptide couplé à la KLH dilué volume à volume avec de l'adjuvant complet de Freund ont été injectés par voie sous-cutanée. Quatre rappels ont été effectués à un intervalle de 3 semaines avec 100µg du peptide couplé à la KLH dilué volume à volume avec de l'adjuvant incomplet de Freund, injectés par voie sous-cutanée.

Trois jours avant la réalisation de la fusion lymphocytaire, la souris a subi une hyper-immunisation selon le protocole suivant : la dose totale d'immunogène, ici 100µg de peptide C-YTLRAPRSPKMVQGSG-NH₂ couplé à la KLH en tampon PBS stérile, est fractionnée en 4 injections. La première et la seconde injections correspondent chacune à 1/10ème de la dose totale. Ces injections sont réalisées par voie sous-cutanée en différents endroits et à 45 minutes d'intervalle. La troisième injection, qui correspond aux 2/10èmes de la dose totale, est réalisée 45 minutes après la seconde injection, par voie sous-cutanée. Trente minutes après la troisième injection, une injection par voie

intrapéritonéale de 100µl d'une solution de prométhazine à 1mg/ml en PBS stérile (Phénergan à 2,5%, Laboratoires Medeva Parma) est réalisée afin de prévenir tout choc anaphylactique. Enfin 15 minutes après, la dernière injection correspondant aux 6/10èmes de la dose totale est effectuée par voie intrapéritonéale.

L'hybridation lymphocytaire est réalisée selon la méthode décrite par Koehler et Milstein (Nature, 1975; 256:495-97). Elle est réalisée à partir des cellules lymphocytaires extraites de la rate de la souris et des cellules myélomateuses (P3-X63-Ag8.653) préalablement mises en culture en milieu RPMI 1640 (Bio-Whittaker # BE12-167F), complémenté avec un mélange de L-glutamine, pénicilline et streptomycine (Sigma # G-6784), additionné de 10% de sérum de veau foetal préalablement décomplémenté (Bio-Whittaker #BE02701E) et de 8-azaguanine (Sigma # A-8526). Les cellules lymphocytaires et les cellules myélomateuses, préalablement placées en milieu RPMI 1640 (Bio-Whittaker # BE12-167F) complémenté avec un mélange de L-glutamine, pénicilline et streptomycine (Sigma # G-6784) sans addition de sérum de veau foetal, sont mélangées à raison de 5 cellules lymphocytaires pour 1 cellule myélomateuse. Après centrifugation du mélange 7 minutes à 900 tr/mn à température ambiante, et remise en suspension du culot cellulaire, 1ml de polyéthylène glycol Hybri-Max® (Sigma # P-7777) est ajouté. Après 1 minute d'incubation au bain marie à 37°C, les cellules sont centrifugées pendant 1 minute et trente secondes à 1000 tr/mn à température ambiante. Enfin après incubation de 2 minutes au bain marie à 37°C, le culot est remis en suspension et 6 ml de milieu RPMI 1640 (Bio-Whittaker # BE12-167F) complémenté avec un mélange de L-glutamine, pénicilline et streptomycine (Sigma # G-6784) préalablement placé à 37°C, sont ajoutés à raison de 100µl toutes les 5 secondes, et 9ml de ce même milieu sont ajoutés en une fois. Après centrifugation pendant 10 minutes à 900 tr/mn à TA, et élimination du surnageant, le culot est repris par du milieu RPMI 1640 (Bio-Whittaker # BE12-167F), complémenté avec un mélange de L-glutamine, pénicilline et streptomycine (Sigma # G-6784), additionné de 15% de sérum de veau foetal préalablement décomplémenté (Bio-Whittaker # BE02701E) et de HAT (Hypoxanthine, aminoptérine, thymidine Sigma # H-0262), de façon à

distribuer, sous 100µl, 120 000 cellules par puits. La solution est déposée sous 100µl dans les puits des plaques de culture à 96 puits préalablement ensemencés de macrophages murins. Les plaques sont ensuite placées dans un incubateur à CO₂. Quinze jours après l'hybridation lymphocytaire, le nombre
5 de clones présents dans les plaques de fusion est estimé et exprimé en pourcentage de développement des hybridomes.

La sélection des hybridomes est effectuée en ELISA sur proBNP(1-108), BNP(1-76), BNP(77-108) et un peptide porteur de la séquence RAPR₇₆S₇₇P (C13P30). Seuls les hybridomes sécrétant des anticorps
10 capables de détecter le proBNP(1-108) et le peptide C13P30 porteur de la séquence RAPR₇₆S₇₇P et ne reconnaissant substantiellement pas le BNP(1-76) ni le BNP(77-108), sont retenus. Les hybridomes sélectionnés sont maintenus en culture et clonés en dilution limite. Les hybridomes ainsi clonés peuvent ensuite être utilisés pour la production de l'anticorps monoclonal en
15 liquide d'ascite.

C'est ainsi que les inventeurs ont produit un hybridome murin, le clone 3D4, sécrétant une immunoglobuline d'isotype IgG₁κ présentant les caractéristiques des anticorps selon l'invention. Cet hybridome a été déposé le
20 31 juillet 2003 à la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75 724 Paris, Cedex 15, France) sous le numéro d'enregistrement CNCM I-3073.

L'invention a donc encore pour objets l'hybridome 3D4 déposé à la CNCM sous le numéro d'enregistrement CNCM I-3073 et l'anticorps monoclonal qu'il sécrète.

Exemple 12 : Validation en ELISA de la spécificité de l'anticorps produit par l'hybridome 3D4

Matériels :

1) Phase solide : microplaque Maxisorp à fond plat, Nunc
30 (Danemark).

2) Le BNP(77-108) provient de Sigma (# B-5900), tandis que le proBNP(1-108) et le BNP(1-76) ont été produits sous forme de protéines recombinées. La concentration de ces solutions de protéines a été déterminée

par la méthode Bradford de dosage colorimétrique des protéines (Bradford M. Anal. Biochem. 1976;72:248-54).

3) Le conjugué utilisé est un anticorps polyclonal d'âne anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Jackson Immunoresearch # 715-035-150)

5 4) Tampon de saturation : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 1% d'albumine bovine sérique (BSA, Sigma # A-7888)

5) Tampon de dilution : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de BSA et 0,1% de Tween 20.

10 6) Solution de lavage : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de Tween 20.

7) Solution de révélation: la solution de révélation est composée :

7a) d'un tampon substrat : Solution d'acide citrique 0,01M, et de citrate trisodique 0,04M contenant de l' H_2O_2 à 0,33%, de pH final 5,6, et

15 7b) d'un chromogène : comprimés d'OPD (orthophénylènediamine). 1 comprimé d'OPD à dissoudre dans 10ml de tampon substrat.

8) Solution d'arrêt : H_2SO_4 4N.

Protocole :

20 Le test consiste à évaluer l'immunoréactivité du surnageant de culture de l'hybridome 3D4 directement sur les différentes protéines immobilisées dans les cupules d'une plaque de microtitration.

✓ Plusieurs solutions de sensibilisation en tampon PBS Dulbecco pH 7,4 sont tout d'abord préparées : une première contenant du BNP(77-108) à 1µg/ml, une deuxième contenant du proBNP(1-108) à 1µg/ml, et une troisième contenant du BNP(1-76) à 1µg/ml.

✓ 100µl de chacune de ces solutions sont déposés séparément dans les puits d'une microplaque.

✓ La microplaque est mise à incuber pendant une nuit à 4°C.

30 ✓ Après élimination de la solution de sensibilisation, la microplaque est lavée à l'aide d'un tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de Tween 20, puis saturée par addition de 250µl du tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 1% de BSA.

✓ La microplaque est alors mise à incuber pendant 1 heure à 37°C.

✓ La microplaque est ensuite lavée (3 fois) avec 300 µl de la solution de lavage.

✓ Dans chaque cupule, 100µl de surnageant de l'hybridome 3D4, préalablement dilué au 1/2 dans le tampon de dilution, sont déposés.

✓ Le milieu réactionnel est mis à incuber 2 heures à température ambiante

✓ La microplaque est ensuite lavée 3 fois avec 300µl de la solution de lavage.

✓ 100 µl de conjugué, anticorps polyclonal anti-IgG de souris couplé à la peroxydase dilué au 1/2000 en tampon de dilution, sont ajoutés à chaque puits de la microplaque.

✓ Le milieu réactionnel mis à incuber pendant 1 heure à température ambiante.

✓ Les plaques sont ensuite lavées (5 lavages) avec 300µl de la solution de lavage. Dans chaque cupule, 100 µl de la solution de révélation sont distribués. On laisse la réaction se développer à l'obscurité pendant 20 minutes à température ambiante (18-24°C).

✓ Ensuite 50 µl de la solution d'arrêt sont distribués dans chaque cupule.

✓ Après arrêt de la réaction, la lecture de la densité optique est effectuée au spectrophotomètre à 490/620 nm.

La figure 8 illustre le résultat de ce test : l'anticorps produit dans le surnageant de l'hybridome 3D4 est capable de détecter uniquement le proBNP(1-108) et le peptide d'immunisation C13P30, aucune réactivité n'est obtenue sur le BNP(1-76) et le BNP(77-108). Ces résultats valident la spécificité de l'anticorps produit par l'hybridome 3D4 pour le proBNP(1-108) à l'exclusion du BNP(1-76) et du BNP(77-108).

L'anticorps selon l'invention issu de l'hybridome 3D4 est donc bien un anticorps reconnaissant de façon spécifique le proBNP(1-108), à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108).

Exemple 13 : Validation en western-blot de la spécificité de l'anticorps produit par l'hybridome 3D4

Matériels :

- 1) Appareillage d'électrophorèse SDS-PAGE classique
- 2) Gel de concentration : acrylamide à 5%
- 3) Gel de séparation : acrylamide à 16%
- 4) Tampon anode : Tris 0,2M, pH 8,9
- 5) Tampon cathode : Tris-tricine 0,1M ; SDS à 0,1%
- 6) Tampon de l'échantillon : Tris 0,5M, pH 6,8 ; glycérol à 25% ; SDS à 2% ;
bêta-mercaptoéthanol 14,4mM ; bleu de bromophénol à 0,1%
- 7) Appareil de transfert électrophorétique
- 8) Tampon de transfert : Tris base 25 mM ; glycine 190 mM ; méthanol à
20% ; SDS à 0,05%
- 9) Le BNP(77-108) provient de Sigma (# B-5900), tandis que le proBNP(1-
108)-GST, le BNP(1-76)-GST et la GST (utilisée comme témoin négatif) ont
été produits sous forme de protéines recombinées. La concentration de ces
solutions de protéines a été déterminée par la méthode Bradford de dosage
colorimétrique des protéines (Bradford M. Anal. Biochem. 1976;72:248-54).
- 10) Le conjugué utilisé est un anticorps polyclonal d'âne anti-IgG de souris
couplé à la peroxydase (Jackson Immunoresearch # 715-035-150)
- 11) Trousse ECL de detection en western-blot (Amersham Biosciences
RPN2106)

Protocole :

La mise œuvre de ce test comprend trois grandes étapes : la migration électrophorétique des différentes protéines dans un gel d'acrylamide à 16%, ensuite le transfert de ces protéines sur une membrane de nitrocellulose, et enfin le western-blot.

✓ Diverses solutions sont préparées en tampon d'échantillon sous un volume final de 35 µl : une première comprenant 1µg de proBNP(1-108)-GST, une deuxième comprenant 1µg de GST, une troisième comprenant 1µg de

BNP(1-76)-GST, et une quatrième comprenant 1µg de BNP(77-108).

✓ Chaque solution est mise à incuber au bain-marie pendant 5 minutes à 100°C, puis déposée dans un puits du gel. La migration au travers le gel d'acrylamide est réalisée sous voltage constant à 120 V pendant 1heure
5 30. La figure 9 correspond à une photographie du gel d'acrylamide obtenu. Les protéines déposées sont colorées par le bleu de coomassie.

✓ Après migration, les protéines du gel sont mises à transférer sur une membrane de nitrocellulose durant 1 heure sous 120 mA.

✓ La membrane de nitrocellulose est ensuite lavée avec du tampon
10 PBS + Tween à 0,1%, et mise à saturer pendant 30 minutes à température ambiante en tampon PBS + Tween à 0,1% + lait écrémé à 2%

✓ Après 3 lavages avec du tampon PBS + Tween 0,1%, la membrane est mise à incuber pendant 1 heure à +37°C, sous agitation, avec 5 ml de surnageant de l'hybridome 3D4.

✓ Après 3 lavages avec le tampon PBS + Tween à 0,1%, la membrane
15 est mise à incuber pendant 1 heure à température ambiante sous agitation avec 10 ml de conjugué anti-IgG de souris couplé à la peroxydase dilué au 1/2000 en tampon PBS + Tween 0,1% + lait écrémé à 2%

✓ Après 3 lavages avec le tampon PBS + Tween 0,1%, la membrane
20 est trempée dans le réactif de révélation ECL, avant d'être exposée à un film photographique pendant 4 minutes.

Comme le montre la figure 10 qui correspond à l'image scannée de la photographie obtenue, l'anticorps produit dans le surnageant de l'hybridome 3D4 est capable de détecter uniquement la bande correspondant au
25 proBNP(1-108). Le BNP(1-76), le BNP(77-108), ainsi que la GST ne sont pas détectées par l'anticorps de l'hybridome 3D4. Ces résultats valident également la spécificité l'anticorps produit par l'hybridome 3D4 pour le proBNP(1-108).

L'anticorps selon l'invention issu de l'hybridome 3D4 est donc bien un anticorps reconnaissant de façon spécifique le proBNP(1-108), à l'exclusion
30 substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108).

Exemple 14 : Identification de l'épitope reconnu par l'anticorps produit par l'hybridome 3D4 par la méthode spot

Le surnageant de l'hybridome 3D4 a été testé par la méthode spot (décrite dans l'exemple 6) afin d'identifier l'épitope reconnu par l'anticorps de l'hybridome 3D4. Les résultats obtenus indiquent que l'anticorps 3D4 reconnaît effectivement des séquences peptidiques comprenant le motif RAPR₇₆S₇₇P.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en ELISA (exemple 12) et western-blot (exemple 13) validant la spécificité de l'anticorps 3D4 pour le proBNP(1-108).

Exemple 15 : dosage radioimmunométrique du proBNP(1-108)

Matériels :

1) Phase solide : microplaque Maxisorp à fond plat et puits sécables, Nunc (Danemark).

2) L'anticorps de capture utilisé est l'anticorps polyclonal obtenu à partir du sérum du lapin # 046 805 non épuisé.

3) Le conjugué utilisé est un anticorps anti-BNP(77-108) marqué à l'I¹²⁵ (anti-BNP-I¹²⁵). Il s'agit de l'anticorps traceur du kit BNP Shionoria commercialisé par la société Shionogi.

4) Tampon de saturation : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 1% d'albumine bovine sérique (BSA, Sigma # A-7888)

5) Tampon de dilution : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de BSA et 0,1% de tween 20 (Sigma, # P-1379).

4) Tampon de lavage : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de Tween 20.

5) Etalon proBNP(1-108) : produit sous forme de protéine recombinée.

Protocole :

Le principe du test utilisé est basé sur la méthode radioimmunologique de type sandwich , réalisé en microplaque à fond plat et à cupules sécables. Il

s'agit d'un test en un temps où échantillon (ou solution étalon de proBNP(1-108)) et traceur sont ajoutés l'un après l'autre sans lavage intermédiaire.

✓ Une solution de sensibilisation est tout d'abord préparée avec l'anticorps polyclonal du lapin # 046 805 dilué en tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 à 40µg/ml. 300µl de cette solution sont déposés dans chacun des puits de la microplaque.

✓ La microplaque est mise à incuber pendant une nuit à 4°C.

✓ Après élimination de la solution de sensibilisation, la microplaque est lavée à l'aide de 300 µl d'un tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de Tween 20, puis saturée par addition de 300µl du tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 1% de BSA.

✓ La microplaque est alors mise à incuber pendant 1heure à 37°C.

✓ La microplaque est ensuite lavée (3 fois) à l'aide de 300 µl de la solution de lavage (tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 additionné de Tween 20 à 0,1%).

✓ Dans chaque cupule, 100µl de solution étalon de proBNP(1-108), de sérum ou de plasma sont déposés. Le proBNP(1-108), s'il est présent, se lie à l'anticorps de capture retenu sur la phase solide.

✓ 200µl de la solution de traceur anti-BNP-I¹²⁵ prête à l'emploi (extraite du kit BNP Shionoria de Shionogi) sont ajoutés dans chacun des puits.

✓ Le milieu réactionnel est mis à incuber pendant une nuit (18-22h) à 4°C.

✓ Le lendemain, la microplaque est lavée (3 fois) à l'aide de 300µl de la solution de lavage. Au dernier lavage et après aspiration de la solution de lavage, chaque cupule est transférée dans un tube préalablement identifié.

✓ La radioactivité présente dans chaque cupule et proportionnelle à la quantité de traceur fixée, donc à la quantité de proBNP(1-108) présente dans l'échantillon, est mesurée à l'aide d'un compteur gamma.

La figure 11 présente les résultats obtenus à l'aide d'une gamme étalon de proBNP(1-108).

Exemple 16 : résultats du dosage d'échantillons humains

A l'aide du dosage IRMA proBNP(1-108) selon l'invention décrit dans l'exemple 15 et du dosage BNP(1-76) commercialisé par la société Roche et réalisé sur l'automate Elecsys®, 14 prélèvements de sujets sains et 15 prélèvements de patients souffrant d'insuffisance cardiaque ont été testés. Les échantillons sanguins ont tous été prélevés sur tube contenant de l'EDTA. La figure 12 présente les résultats en cpm (coups par minute) des tests de ces échantillons avec le dosage IRMA proBNP(1-108) selon l'invention. Les résultats obtenus sur les prélèvements de patients souffrant d'insuffisance cardiaque sont significativement plus élevés que ceux obtenus sur les prélèvements de sujets sains. Ces résultats mettent en évidence la présence de proBNP(1-108) circulant dans les prélèvements de patients souffrant d'insuffisance cardiaque et constituent la première démonstration que le proBNP(1-108) sérique est un marqueur prédictif de l'insuffisance cardiaque. La figure 13 présente la corrélation entre les concentrations de proBNP(1-108) (en pg/ml) déterminées à l'aide du dosage IRMA proBNP selon l'invention et les concentrations de BNP(1-76) (pg/ml) déterminées à l'aide du dosage Roche sur l'automate Elecsys®, des prélèvements de 14 patients souffrant d'insuffisance cardiaque. La corrélation observée est significative avec un coefficient $R^2 = 0,85$.

Exemple 17 : couplage de l'anticorps polyclonal du lapin #046 805 à la biotine

La méthode de couplage utilise un dérivé N-Hydroxy Succinimide (NHS) de la biotine qui réagit avec les amines primaires des IgG pour former une liaison amide.

Une solution de (+)-Biotine N-succinimidyl ester (Fluka # 14405) à 100mM est préparée par dissolution de la Biotine dans de la diméthylformamide. La biotinylation est réalisée dans un flacon en verre. 500 µg de l'anticorps polyclonal du lapin # 046 805 préalablement purifié mais non épuisé sont déposés dans le flacon avec 17µl de la solution de biotine 100mM (le rapport molaire biotine/anticorps est de 500). La réaction se fait en tampon PBS Dulbecco à pH 7,4. Le mélange réactionnel est mis à incuber pendant 1

heure 30 à température ambiante sous agitation lente. Après couplage, la biotine est inactivée par ajout d'un volume de tampon glycine 2M. Le mélange est mis incubé pendant 10 minutes à température ambiante sous agitation lente. Enfin le mélange est mis à dialyser une nuit à 4°C contre du tampon PBS Dulbecco à pH 7,4. Le lendemain, une solution d'azoture de sodium est ajoutée à 0,02% en concentration finale. Le conjugué est conservé à 4°C.

Exemple 18 : Dosage immunoenzymométrique du proBNP(1-108)

Un dosage immunoenzymométrique selon l'invention a également été mis au point.

Matériels :

- 1) Phase solide : microplaque Maxisorp à fond plat, Nunc (Danemark).
- 2) L'anticorps de capture utilisé est un anticorps polyclonal anti-BNP(77-108) commercialisé par la société Strategic Biosolution (# B9105RA00-A0).
- 3) Le conjugué utilisé est l'anticorps polyclonal du lapin # 046 805 non épuisé couplé à la biotine selon le procédé décrit dans l'exemple 17.
- 4) Conjugué streptavidine-peroxydase (Amersham Pharmacia Biotech # RPN1231V)
- 5) Tampon de saturation : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 1% d'albumine bovine sérique (BSA, Sigma # A-7888)
- 6) Tampon de dilution : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de BSA et 0,1% de Tween 20.
- 7) Solution de lavage : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de Tween 20.
- 8) Etalon proBNP(1-108) : protéine recombinée.
- 9) Solution de révélation: la solution de révélation est composée :
 - 9a) d'un tampon substrat : Solution d'acide citrique 0,01M, et de citrate trisodique 0,04M contenant de l'H₂O₂ à 0,33%, de pH final 5,6, et
 - 9b) d'un chromogène : comprimés d'OPD (orthophénylènediamine). 1 comprimé d'OPD à dissoudre dans 10ml de tampon substrat.
- 10) Solution d'arrêt : H₂SO₄ 4N.

Protocole :

Le principe du test utilisé est basé sur la méthode enzymoimmunologique de type sandwich, réalisé en microplaque à fond plat. Il s'agit d'un test en deux temps où l'échantillon (ou la solution étalon) est tout d'abord mis à incuber avec l'anticorps de capture, puis après incubation et lavages, l'anticorps de détection est ajouté.

✓ Une solution de sensibilisation est tout d'abord préparée avec l'anticorps polyclonal anti-BNP(77-108) dilué en tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 à 10µg/ml. 100µl de cette solution sont déposés dans chacun des puits de la microplaque.

✓ La microplaque est mise à incuber pendant une nuit à 4°C.

✓ Après élimination de la solution de sensibilisation, la microplaque est lavée à l'aide de 300 µl d'un tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de Tween 20, puis saturée par addition de 250µl du tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 1% de BSA.

✓ La microplaque est alors mise à incuber pendant 1 heure à 37°C.

✓ La microplaque est ensuite lavée (3 fois) à l'aide de la solution de lavage.

✓ Dans chaque cupule, 100µl de solution étalon de proBNP(1-108), de sérum ou de plasma sont déposés. Le proBNP(1-108), s'il est présent, se lie à l'anticorps de capture retenu sur la phase solide.

✓ Le milieu réactionnel est mis à incuber 2 heures à température ambiante

✓ La microplaque est ensuite lavée (5 lavages) avec 300µl de la solution de lavage.

✓ 100 µl d'anticorps polyclonal du lapin # 046 805 biotinylé (concentré à 6µg/ml), sont ajoutés dans chaque puits de la microplaque.

✓ Le milieu réactionnel mis à incuber pendant 2 heures à température ambiante.

✓ La microplaque est ensuite lavée (5 lavages) avec 300µl de la solution de lavage.

✓ Enfin 100µl de conjugué streptavidine-POD dilué au 1/1000ème sont ajoutés dans chacun des puits de la microplaque.

✓ Le milieu réactionnel est mis à incuber pendant 1 heure 30 à température ambiante.

5 ✓ Les plaques sont ensuite lavées (5 lavages) avec 300µl de la solution de lavage Dans chaque cupule, 100 µl de la solution de révélation sont distribués. On laisse la réaction se développer à l'obscurité pendant 20 minutes à température ambiante (18-24°C).

10 ✓ Ensuite 50 µl de la solution d'arrêt sont distribués dans chaque cupule.

✓ Après arrêt de la réaction, la lecture de la densité optique est effectuée au spectrophotomètre à 490/620 nm.

15 La figure 14 présente les résultats obtenus à l'aide d'une gamme étalon de proBNP(1-108).

Exemple 19: Evaluation de la réaction croisée, vis à vis du BNP(1-76) et du BNP(77-108), de l'anticorps polyclonal du lapin # 046 805 non épuisé couplé à la biotine, utilisé en sandwich dans le dosage ELISA proBNP(1-108) conjointement à l'anticorps polyclonal anti-BNP(77-108).

20

A l'aide du dosage ELISA du proBNP(1-108) décrit dans l'exemple 18, on a évalué la réaction croisée de l'anticorps anti proBNP(1-108) selon l'invention (lapin # 046 805), non épuisé, biotinylé, vis à vis du BNP(1-76) et du BNP(77-108). Des gammes de concentrations de 5ng/ml à 100ng/ml ont été réalisées avec du proBNP(1-108), du BNP(1-76) et du BNP(77-108) et testées à l'aide du dosage ELISA ProBNP(1-108) décrit dans l'exemple 18. Les résultats de la variation de la densité optique à 490nm en fonction de la concentration sont représentés dans la figure 15 pour chacune des protéines.

25

30 Aucune réaction croisée n'est observée vis à vis du BNP(1-76) ou du BNP(77-108) : le signal obtenu est équivalent au bruit de fond, quelle que soit la concentration testée. Aux concentrations de BNP(1-76) et de BNP(77-108) habituellement retrouvées chez les patients (de l'ordre du ng/ml pour les

concentrations les plus élevées), l'anticorps polyclonal du lapin # 046 805 peut être utilisé dans sa version non épuisée sans entraîner l'apparition de réaction croisée.

5 **Exemple 20 : Evaluation de la réaction croisée, vis à vis du BNP(1-76) et du BNP(77-108), de l'anticorps polyclonal du lapin # 046 805 non épuisé couplé à la biotine, utilisé en sandwich dans le dosage ELISA proBNP(1-108) conjointement à l'anticorps polyclonal anti-NT-proBNP(1-29).**

10 A l'aide d'un dosage ELISA du proBNP(1-108) utilisant le protocole et les réactifs décrits dans l'exemple 18, mis à part que l'anticorps polyclonal anti-BNP(77-108) est ici remplacé par un anticorps polyclonal anti-NT-proBNP(1-29), on a évalué la réaction croisée de l'anticorps polyclonal du lapin # 046 805 non épuisé, biotinylé vis à vis du BNP(1-76) et du BNP(77-108).

15 L'anticorps polyclonal anti-NT-proBNP(1-29) a été produit selon le protocole décrit dans l'exemple 3, mis à part que le peptide utilisé comme immunogène était le peptide NT-proBNP(1-29) couplé à la KLH. Des gammes de concentrations de 5ng/ml à 100ng/ml ont été réalisées avec du proBNP(1-108), du BNP(1-76) et du BNP(77-108) et testées à l'aide du dosage ELISA du
20 proBNP(1-108). Les résultats de la variation de la densité optique à 490nm en fonction de la concentration sont représentés dans la figure 16 pour chacune des protéines. Aucune réaction croisée de l'anticorps polyclonal du lapin #046 805 selon l'invention n'est observée vis à vis du BNP(1-76) ou du BNP(77-108), le signal obtenu est équivalent au bruit de fond, quelle que soit la
25 concentration testée. Aux concentrations de BNP(1-76) et de BNP(77-108) habituellement retrouvées chez les patients (de l'ordre du ng/ml), l'anticorps polyclonal du lapin # 046 805 peut être utilisé dans sa version non épuisé sans entraîner l'apparition d'une réaction croisée.

30 En résumé, il ressort clairement de tout l'exposé qui précède que la présente invention a permis de découvrir un nouvel épitope, RAPR₇₆S₇₇P, situé sur la région charnière du proBNP(108) humain, d'en dériver des peptides immunogéniques le contenant, et d'obtenir des anticorps spécifiques du proBNP(108), qui ne reconnaissent substantiellement pas le BNP(1-76) et le

BNP(77-108), et dont certains d'entre eux ont la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains.

5 Il apparaît aussi clairement que la présente invention a permis la mise au point d'un dosage du proBNP(1-108) circulant permettant ainsi un diagnostic de l'insuffisance cardiaque de façon simple, utilisable en routine et fiable.

REVENDICATIONS

1. Anticorps anti proBNP(1-108) caractérisé en ce que, d'une part, il reconnaît de façon spécifique la séquence RAPR₇₆S₇₇P (SEQ ID N° 5) du proBNP(1-108) et ne reconnaît substantiellement pas les peptides BNP(1-76) ni le BNP(77-108), et, d'autre part, a la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains.

2. Anticorps anti proBNP(1-108) selon la revendication 1 qui reconnaît de façon spécifique la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₅ (SEQ ID N° 4) du proBNP(1-108).

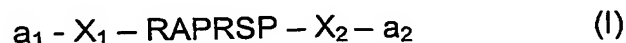
3. Anticorps anti proBNP(1-108) selon la revendication 1 qui reconnaît de façon spécifique la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄ (SEQ ID N° 108) du proBNP(1-108).

4. Procédé d'obtention d'un anticorps anti proBNP(1-108) tel que défini à l'une des revendications 1, 2 et 3 dans lequel on immunise un animal avec la molécule entière de proBNP(1-108),

puis on épuise, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu.

5. Procédé d'obtention d'un anticorps anti proBNP(1-108), tel que défini à l'une des revendications 1, 2 et 3, dans lequel on immunise un animal avec un peptide choisi parmi

- un peptide de formule



où

a₁ peut être H ou représenter une fonction ou un groupement chimique choisi parmi une fonction thiol, alcool, aminoxy, amine primaire ou secondaire, un groupement amino-carboxyle, un groupement biotinyle et un groupement

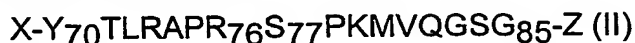
acétyle,

X₁ représente une séquence peptidique de 0 à 3 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

X₂ représente une séquence peptidique de 0 à 7 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

a₂ peut représenter une fonction OH, NH₂ ou un groupement alcoyle ;

- un peptide de formule



où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à

3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108) ;

- un peptide de formule



où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108) ;

- un peptide comprenant une séquence dérivée de la séquence



X-Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄-Z (III) par substitution d'un ou plusieurs parmi les acides aminés Y₇₀, T₇₁, L₇₂, K₇₉, M₈₀, V₈₁, Q₈₂, G₈₃, S₈₄ et G₈₅, avec X pouvant être ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut être une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108) ;

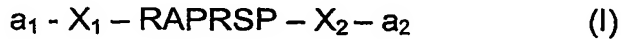
- le peptide ayant la séquence C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G
(C13P30 : SEQ ID N° 16);

- le peptide ayant la séquence C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S
(CN32 : SEQ ID N° 109);

et, éventuellement, on épuise, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu.

6. Procédé d'obtention d'hybridome sécréteur d'un anticorps anti proBNP(1-108), tel que défini à l'une des revendications 1, 2 et 3, dans lequel on immunise un animal avec un peptide choisi parmi

- un peptide de formule



où

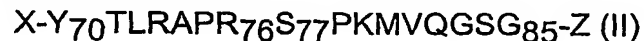
a_1 peut être H ou représenter une fonction ou un groupement chimique choisi parmi une fonction thiol, alcool, aminoxy, amine primaire ou secondaire, un groupement amino-carboxyle, un groupement biotinyle et un groupement acétyle,

X_1 représente une séquence peptidique de 0 à 3 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

X_2 représente une séquence peptidique de 0 à 7 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

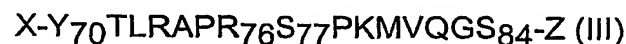
a_2 peut représenter une fonction OH, NH_2 ou un groupement alcoyle ;

- un peptide de formule



où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108) ;

- un peptide de formule



où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108) ;

- un peptide comprenant une séquence dérivée de la séquence $\text{X-Y}_{70}\text{TLRAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{PKMVQGS}_{85}\text{-Z}$ (II) ou de la séquence $\text{X-Y}_{70}\text{TLRAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{PKMVQGS}_{84}\text{-Z}$ (III) par substitution d'un ou plusieurs parmi les acides aminés Y_{70} , T_{71} , L_{72} , K_{79} , M_{80} , V_{81} , Q_{82} , G_{83} , S_{84} et G_{85} , avec X pouvant être ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut être

une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108) ;

- le peptide ayant la séquence C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G
(C13P30 : SEQ ID N° 16);

- le peptide ayant la séquence C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S
(CN32 : SEQ ID N° 109);

on prélève des lymphocytes sécréteurs d'immunoglobulines de cet animal,

et on procède à une fusion des lymphocytes avec des cellules de myélome pour obtenir au moins un hybridome sécréteur d'immunoglobuline.

7. Procédé selon l'une des revendications 5 et 6, dans lequel le peptide de formule (II) a la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₅ (SEQ ID N° 4).

8. Procédé selon l'une des revendications 5 et 6, dans lequel le peptide de formule (III) a la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄ (SEQ ID N° 108)

9. Hybridome susceptible d'être produit par le procédé selon l'une des revendications 6, 7 et 8.

10. Anticorps monoclonal anti proBNP(1-108) sécrété par un hybridome selon la revendication 9.

11. Méthode de diagnostic *in vitro* de l'insuffisance cardiaque chez un humain comprenant la mise en contact d'un échantillon biologique avec un anticorps anti proBNP(1-108) tel que défini dans l'une des revendications 1, 2, 3, et 10, et la détection du proBNP(1-108) dans l'échantillon.

12. Méthode de diagnostic *in vitro* de l'insuffisance cardiaque chez un humain comprenant :

a) la mise en contact d'un échantillon biologique avec un anticorps anti

proBNP(1-108) tel que défini à l'une des revendications 1, 2, 3, et 10,

b) l'incubation du mélange dans des conditions permettant la formation de complexes antigènes-anticorps ; et

c) la révélation des complexes antigènes-anticorps formés, éventuellement à l'aide d'un anticorps de détection, marqué, capable de se lier spécifiquement au proBNP(1-108) présent dans le premier complexe, ou à l'aide d'un antigène de détection, marqué, capable de se lier à l'anticorps dirigé contre ledit proBNP(1-108) présent dans le premier complexe.

13. Méthode de diagnostic selon la revendication 12 qui comprend en plus une étape d) de corrélation de la quantité des complexes antigènes-anticorps révélés à l'état clinique du sujet.

14. Trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique, contenant au moins un anticorps tel que défini dans l'une des revendications 1, 2, 3, et 10.

15. Trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique selon la revendication 14, contenant :

(i) dans un récipient, au moins un anticorps tel que défini dans l'une des revendications 1, 2, 3, et 10;

(ii) dans un autre récipient au moins un peptide choisi parmi

- un peptide de formule

$a_1 - X_1 - \text{RAPRSP} - X_2 - a_2$ (I)

où

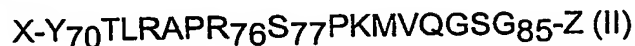
a_1 peut être H ou représenter une fonction ou un groupement chimique choisi parmi une fonction thiol, alcool, aminoxy, amine primaire ou secondaire, un groupement amino-carboxyle, un groupement biotinyle et un groupement acétyle,

X_1 représente une séquence peptidique de 0 à 3 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

X_2 représente une séquence peptidique de 0 à 7 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

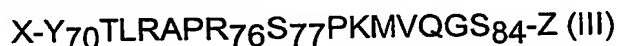
a_2 peut représenter une fonction OH, NH_2 ou un groupement alcoyle ;

- un peptide de formule



où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108) ;

- un peptide de formule



où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108) ;

- un peptide comprenant une séquence dérivée de la séquence



$X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}-Z \text{ (III)}$ par substitution d'un ou plusieurs parmi les acides aminés Y_{70} , T_{71} , L_{72} , K_{79} , M_{80} , V_{81} , Q_{82} , G_{83} , S_{84} et G_{85} , avec X pouvant être ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108) ;

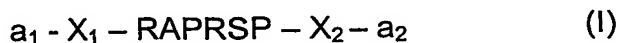
- le peptide ayant la séquence $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQSG_{85}$ (SEQ ID N° 4) ;

- le peptide ayant la séquence $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$ (SEQ ID N° 109) ;

- le peptide ayant la séquence C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G (C13P30 : SEQ ID N° 16) ;

- le peptide ayant la séquence C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S (CN32 : SEQ ID N° 108).

16. Peptide de formule :



où

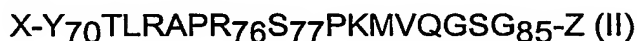
a_1 peut être H ou représenter une fonction ou un groupement chimique choisi parmi une fonction thiol, alcool, aminoxy, amine primaire ou secondaire, un groupement amino-carboxyle, un groupement biotinyle et un groupement acétyle,

X_1 représente une séquence peptidique de 0 à 3 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

X_2 représente une séquence peptidique de 0 à 7 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

a_2 peut représenter une fonction OH, NH_2 ou un groupement alcoxyle.

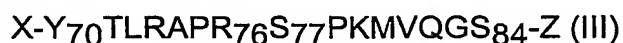
17. Peptide de formule :



où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108).

18. Peptide selon la revendication 17, ayant la séquence $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}$ (SEQ ID N° 4).

19. Peptide de formule :



où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108).

20. Peptide selon la revendication 19, ayant la séquence $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$ (SEQ ID N° 108).

21. Peptide comprenant une séquence dérivée de la séquence

$X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}-Z$ (II) ou de la séquence

$X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}-Z$ (III) par substitution d'un ou

plusieurs parmi les acides aminés Y₇₀, T₇₁, L₇₂, K₇₉, M₈₀, V₈₁, Q₈₂, G₈₃, S₈₄ et G₈₅, avec X pouvant être ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut être une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108).

22. Peptide selon la revendication 16, ayant une séquence choisie dans le groupe constitué par les séquences suivantes

SEQ ID N° 16 : C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G (peptide C13P30)

10 SEQ ID N° 109 : C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S (peptide CN32)

SEQ ID N° 6 : C-G-R-A-P-R-S-P

SEQ ID N° 7 : Acétyl -C-G-R-A-P-R-S-P

SEQ ID N° 8 : C-G-R-A-P-R-S-P-K

SEQ ID N° 9 : Acétyl -C-G-R-A-P-R-S-P-K

15 SEQ ID N° 10 : C-G-R-A-P-R-S-P-K-M-V

SEQ ID N° 11 : C-G-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G

SEQ ID N° 12 : R-A-P-R-S-P-G-C

SEQ ID N° 13 : Acétyl -R-A-P-R-S-P-G-C

SEQ ID N° 110 : C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K

20 SEQ ID N° 111 : C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V

SEQ ID N° 112 : C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q

SEQ ID N° 113 : C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G

SEQ ID N° 19 : C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-βA

SEQ ID N° 20 : C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-A-T-βA

25 SEQ ID N° 114 : Acétyl-C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q

SEQ ID N° 115 : C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G

SEQ ID N° 116 : C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S

SEQ ID N° 117 : C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G

SEQ ID N° 118 : C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V

30 SEQ ID N° 119 : C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q

SEQ ID N° 120 : L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-C

SEQ ID N° 121 : C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S

SEQ ID N° 122 : C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G

23. Procédé d'obtention d'anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₅, la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄ et/ou la séquence RAPR₇₆S₇₇P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle des peptides BNP(1-76) et BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains, procédé dans lequel on immunise un animal avec un peptide tel que défini dans l'une des revendications 16 à 22,

et, éventuellement, on épuise, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu.

24. Procédé d'obtention d'hybridome sécréteur d'un anticorps anti proBNP(1-108), reconnaissant de façon spécifique la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₅, la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄ et/ou la séquence RAPR₇₆S₇₇P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle des peptides BNP(1-76) et BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains, procédé dans lequel on immunise un animal avec un peptide tel que défini dans l'une des revendications 16 à 22,

on prélève des lymphocytes sécréteurs d'immunoglobulines de cet animal,

et on procède à une fusion des lymphocytes avec des cellules de myélome pour obtenir au moins un hybridome sécréteur d'immunoglobuline.

25. Anticorps anti proBNP(1-108), caractérisé en ce qu'il est obtenu par un procédé selon la revendication 23.

26. Anticorps anti proBNP(1-108) selon la revendication 25, qui reconnaît de façon spécifique la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₅ ou la séquence Y₇₀TLRAPR₇₆S₇₇PKMVQGS₈₄ du proBNP(1-108).

27. Hybridome susceptible d'être produit par le procédé selon la

revendication 24.

28. Anticorps monoclonal anti proBNP(1-108) sécrété par un hybridome selon la revendication 27.

29. Anticorps monoclonal anti proBNP(1-108) selon la revendication 28 sécrété par l'hybridome 3D4 déposé à la CNCM sous le N°CNM I-3073.

30. Méthode de diagnostic *in vitro* de l'insuffisance cardiaque chez un humain comprenant la mise en contact d'un échantillon biologique avec un anticorps anti proBNP(1-108) tel que défini dans l'une quelconque des revendications 25, 26, 28, et 29, et la détection du proBNP(1-108) dans l'échantillon.

31. Méthode de diagnostic *in vitro* de l'insuffisance cardiaque chez un humain comprenant :

a) la mise en contact d'un échantillon biologique avec un anticorps anti proBNP(1-108) tel que défini à l'une des revendications 25, 26, 28, et 29,

b) l'incubation du mélange dans des conditions permettant la formation de complexes antigènes-anticorps ; et

c) la révélation des complexes antigènes-anticorps formés, éventuellement à l'aide d'un anticorps de détection, marqué, capable de se lier spécifiquement au proBNP(1-108) présent dans le premier complexe, ou à l'aide d'un antigène de détection, marqué, capable de se lier à l'anticorps dirigé contre ledit proBNP(1-108) présent dans le premier complexe.

32. Méthode de diagnostic selon la revendication 31 qui comprend en plus une étape d) de corrélation de la quantité des complexes antigènes-anticorps révélés à l'état clinique du sujet.

33. Trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique, contenant au moins un anticorps tel que défini dans l'une des revendications 25, 26, 28, et 29.

5

34. Trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique, contenant, comme étalon et/ou témoin, au moins un peptide tel que défini dans l'une des revendications 16 à 22.

10

35. Trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique, contenant :

- dans un récipient, au moins un anticorps tel que défini dans l'une des revendications 25, 26, 28, et 29;

15

- dans un autre récipient au moins un peptide tel que défini dans l'une des revendications 16 à 22.

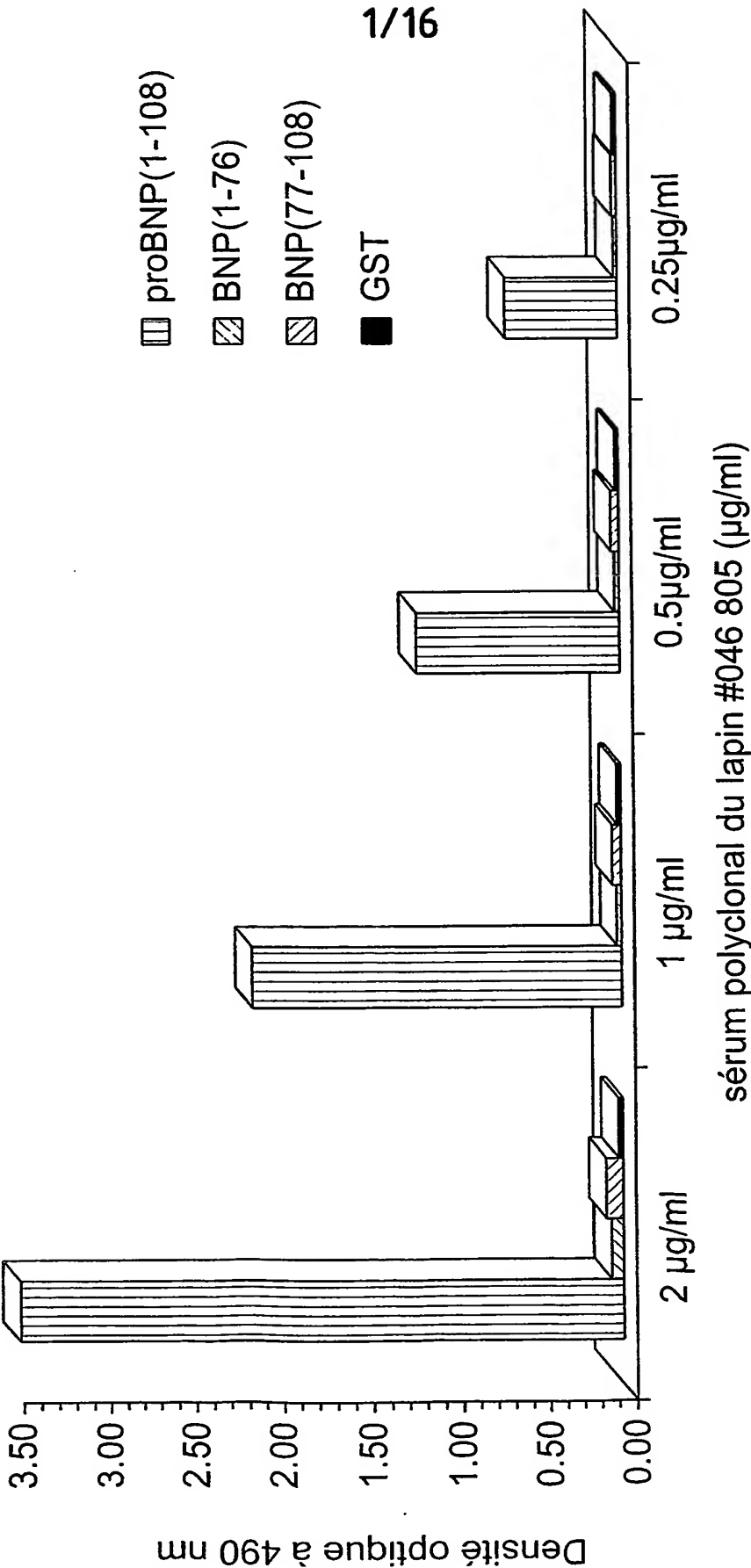
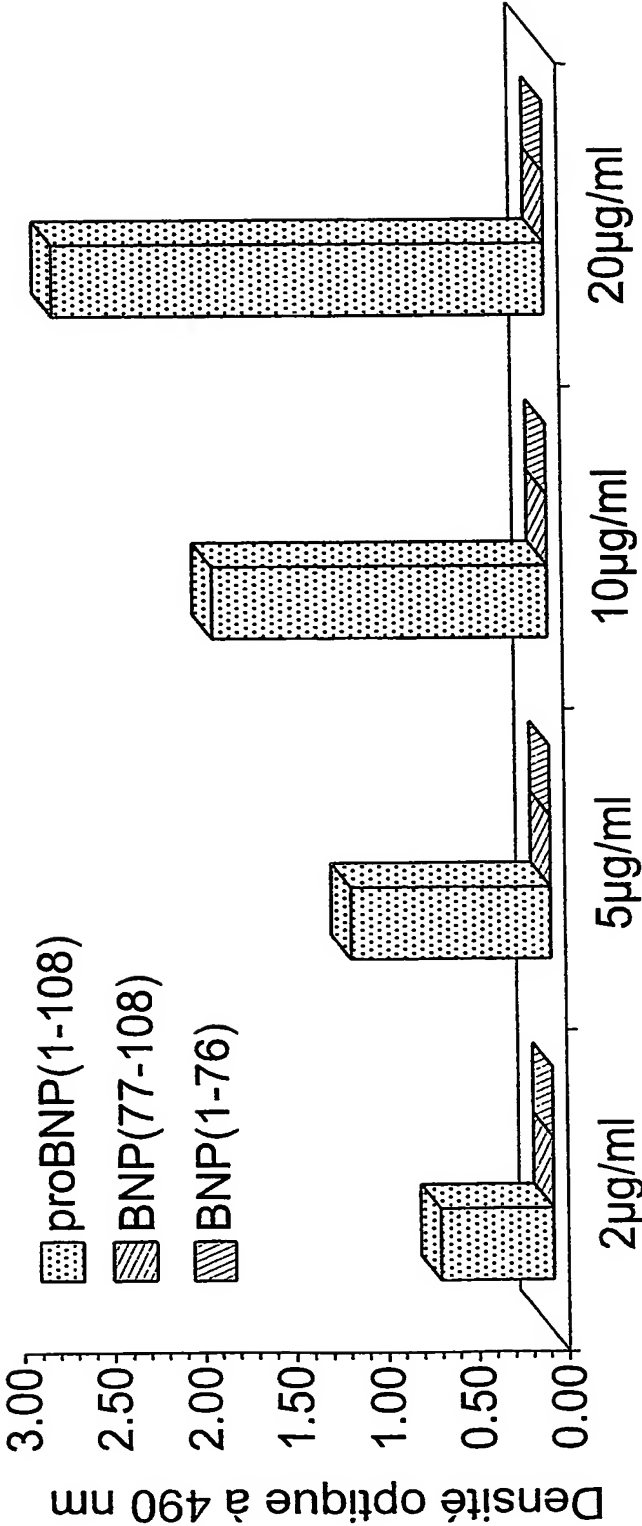


FIG.1



Filtrat du sérum polyclonal du lapin #046 805 (µg/ml)

FIG.2

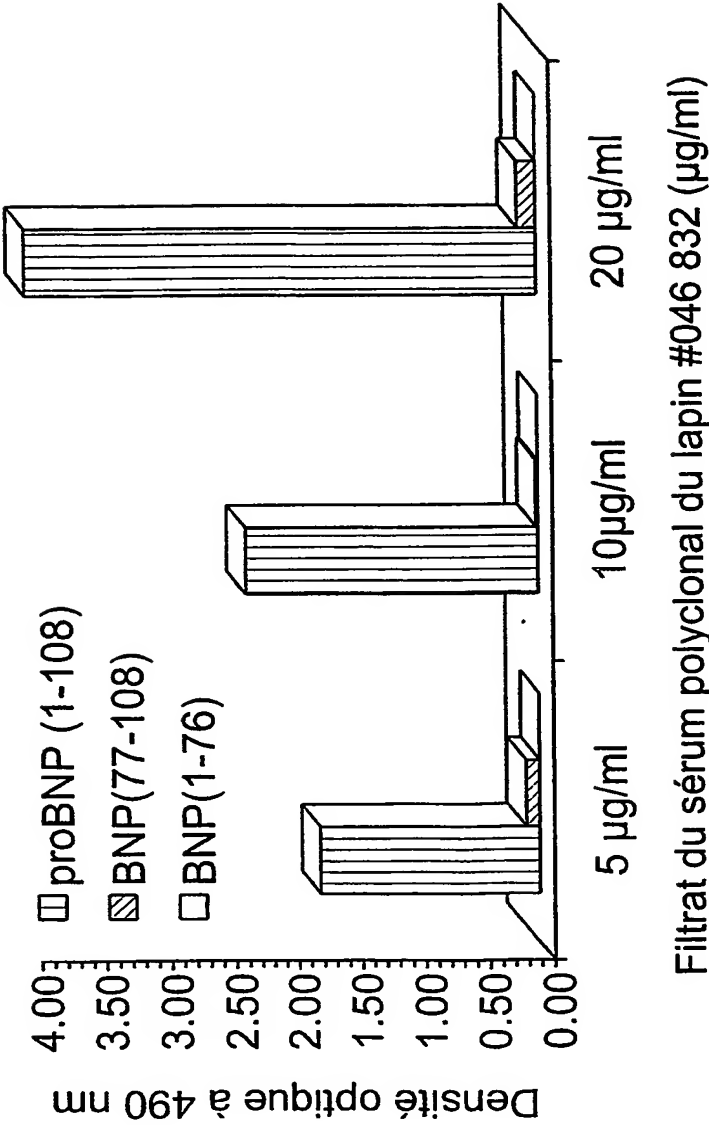
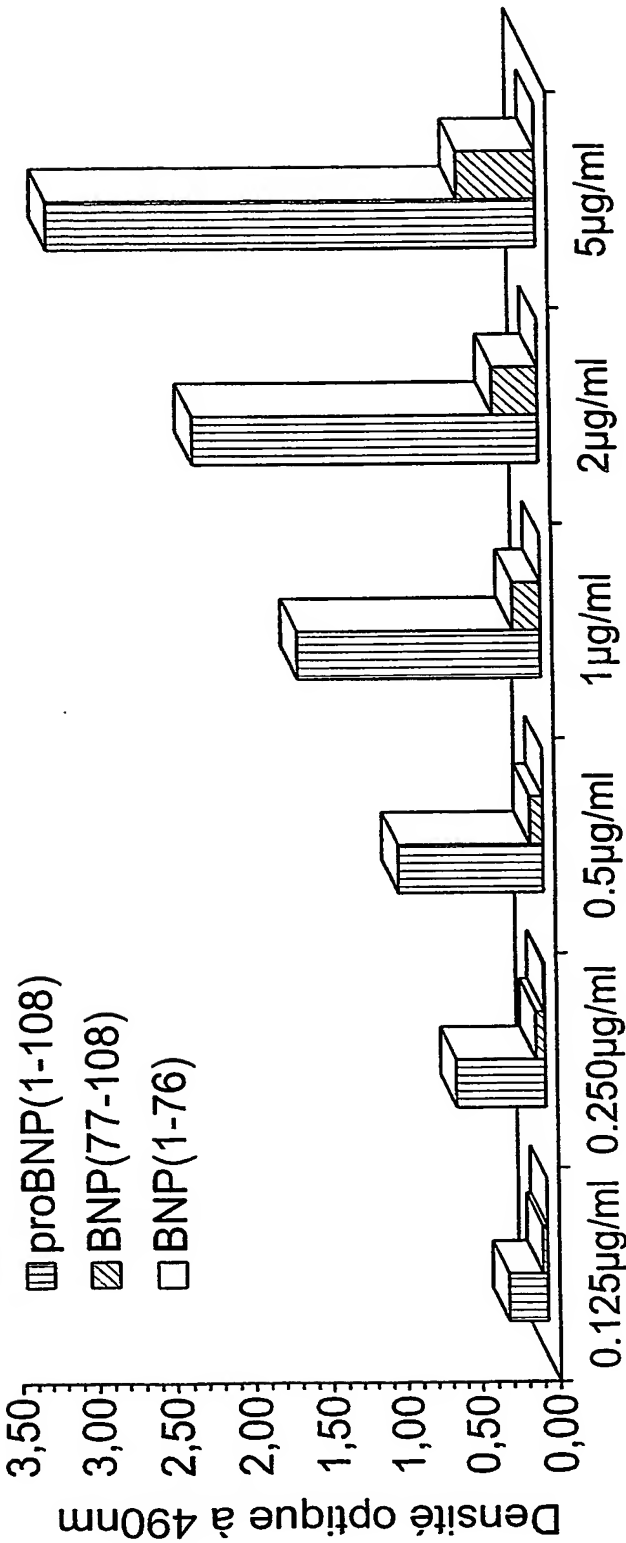


FIG.3

Filtrat du sérum polyclonal du lapin #046 832 (µg/ml)

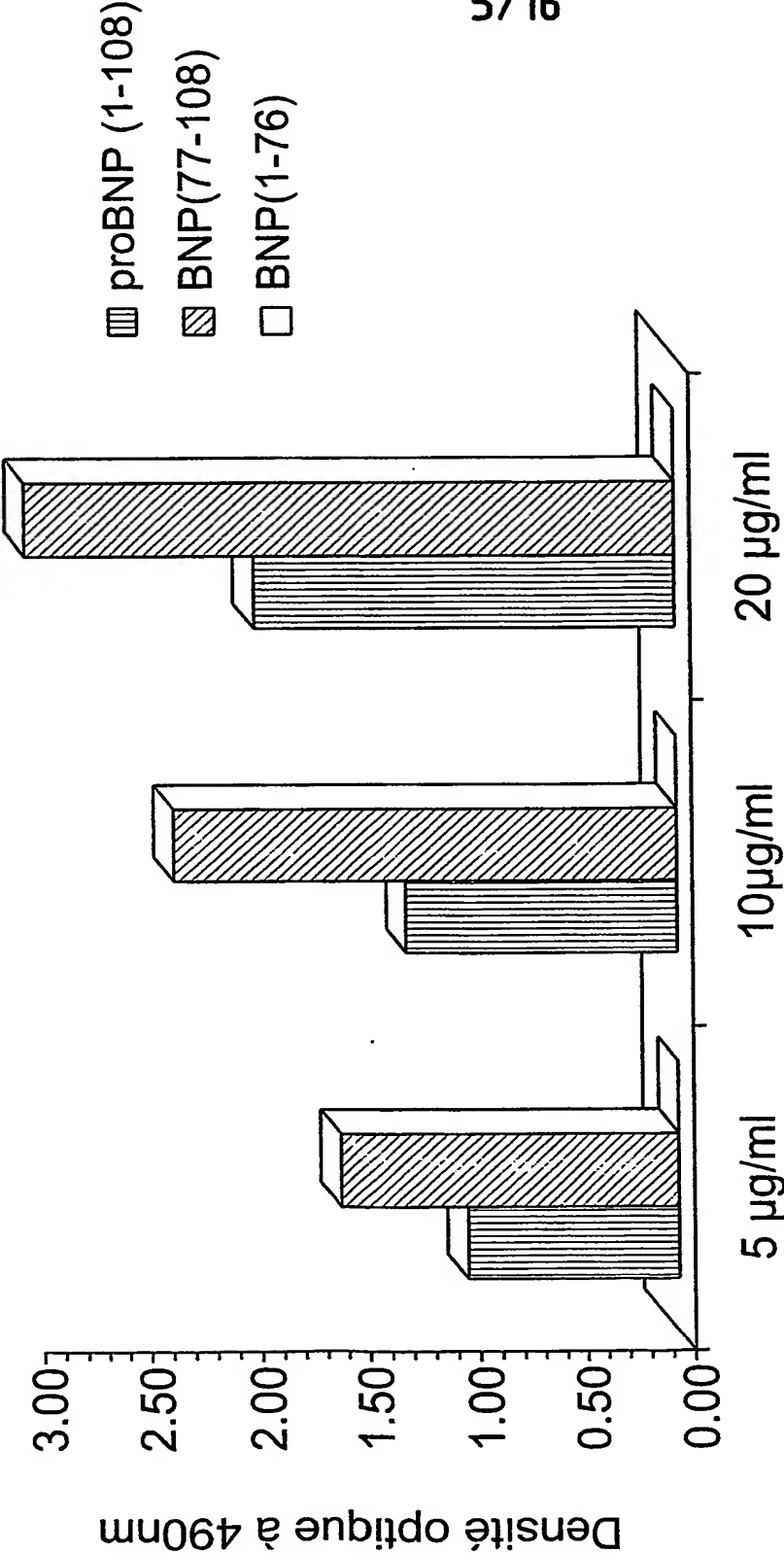
4/16



Eluat du sérum polyclonal du lapin #046 805 (µg/ml)

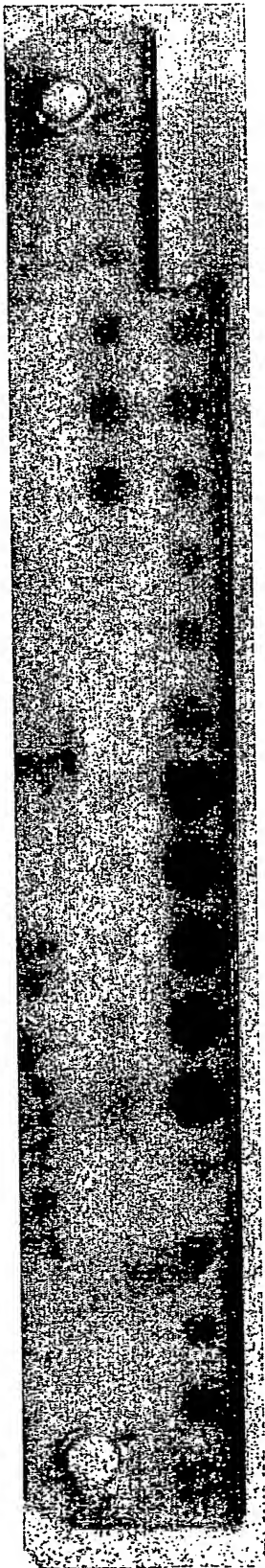
FIG.4

5/16



Eluat du sérum polyclonal du lapin #046 832 (µg/ml)

FIG.5

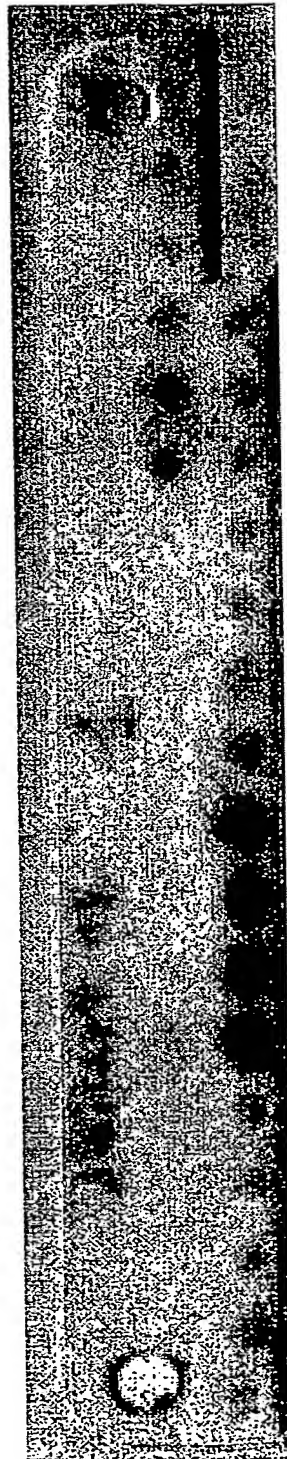


Réactivité (en unités relatives d'intensité) :

21	IRGHRKMVLYTLRAP	32.8	} Spots détectés
22	HRKMVLYTLRAPRSP	104.8	
23	MVLYTLRAPRSPKMOV	99.2	
24	YTLRAPRSPKMOVQGS	117.5	
25	RAPRSPKMOVQSGCF	119.0	
26	RSPKMOVQSGCFGRK	84.5	
27	KMVQSGCFGRKMDR	33.0	

FIG.6

7/16



Réactivité (en unités relatives d'intensité)

32,0
125,9
104,2
121,1
113,7
35,0

Spots détectés

21 IRGHRKMVLYTLRAP
22 HRKMVLYTLRAPRSP
23 MVLYTLRAPRSPKMV
24 YTLRAPRSP KMOVQS
25 RAPRSP KMOVQSGCF
26 RSPKMVQSGGCFGRK

FIG.7

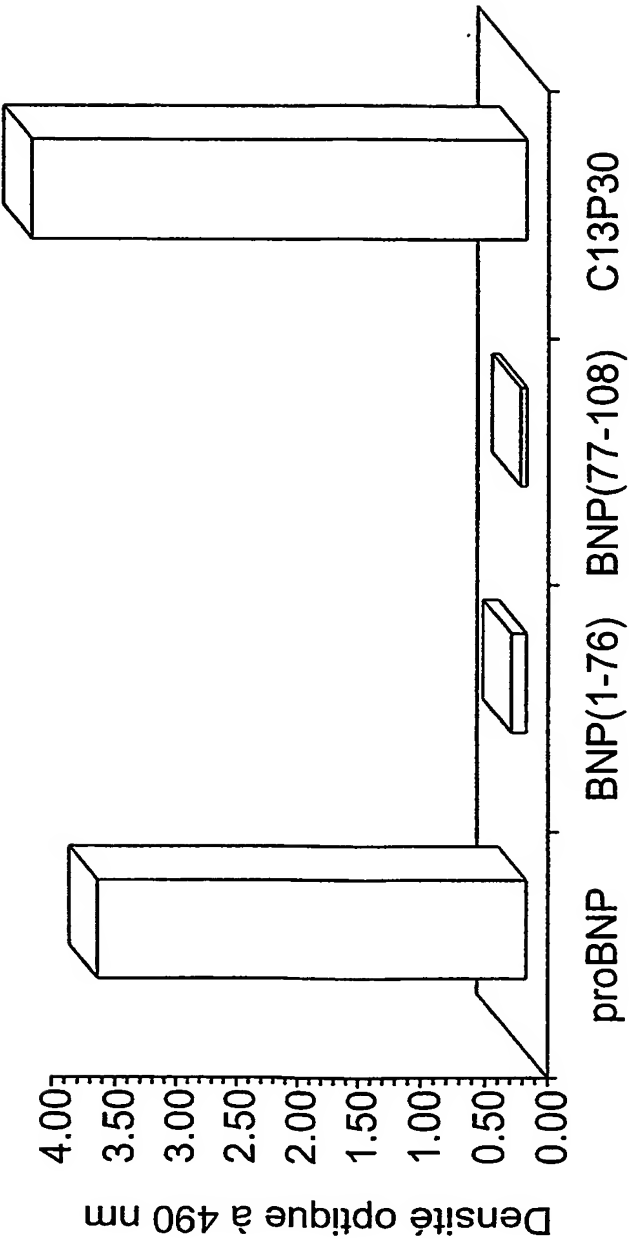


FIG. 8

9/16

1 2 3 4 5

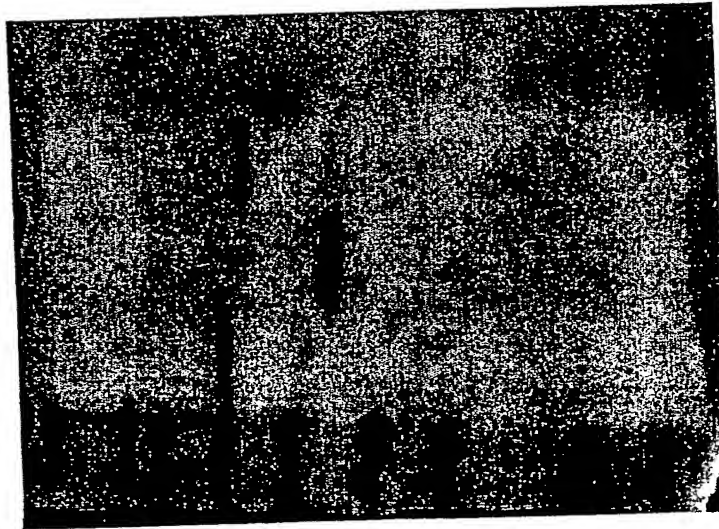
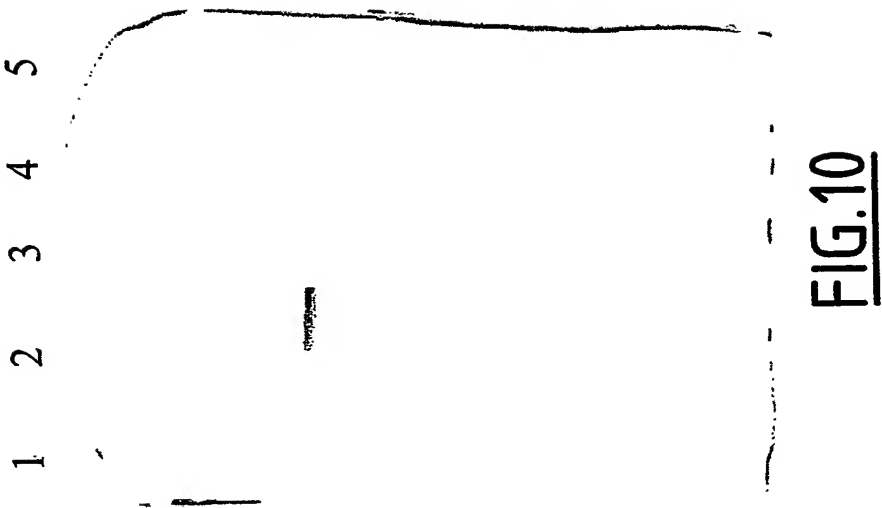
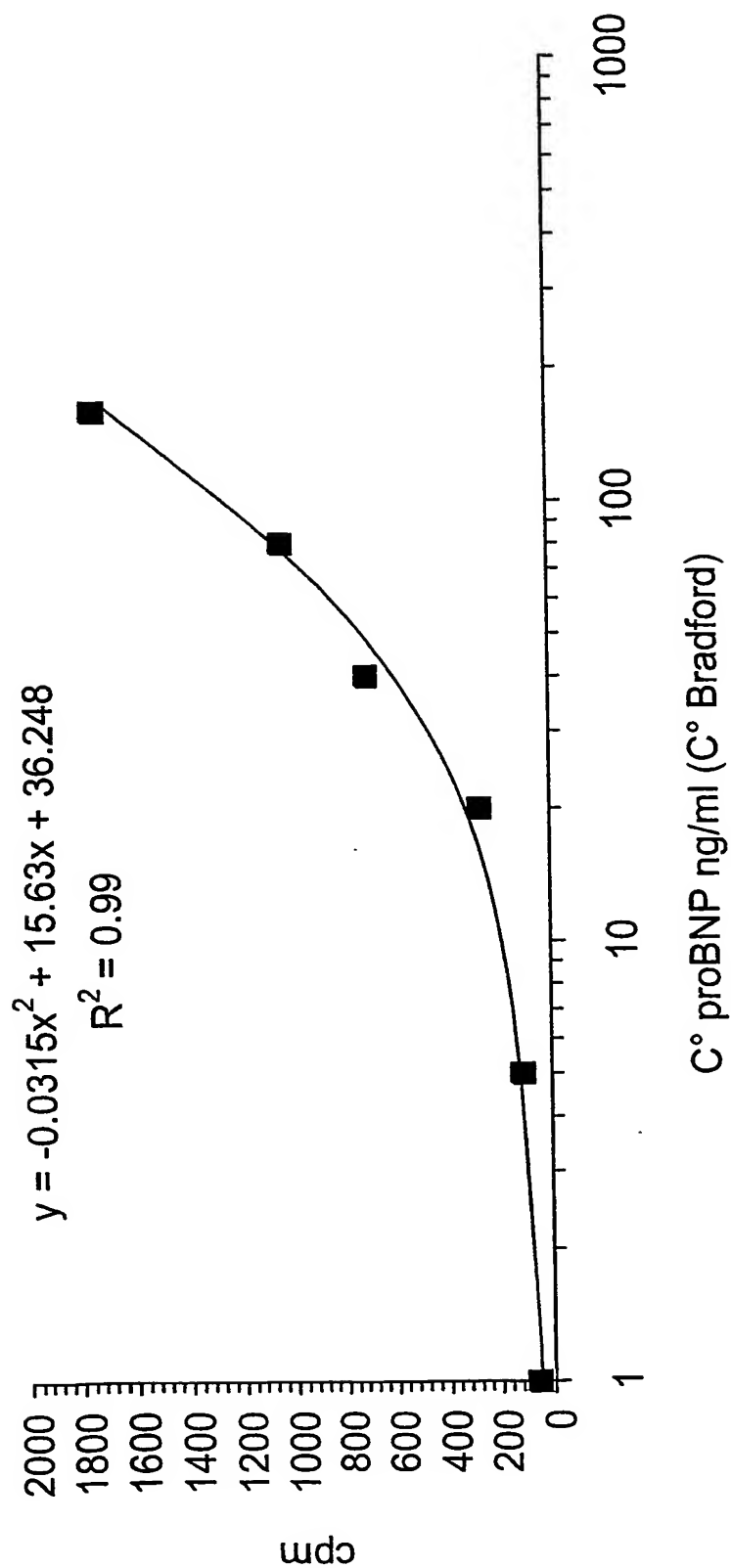


FIG. 9

10/16



11/16

FIG.11

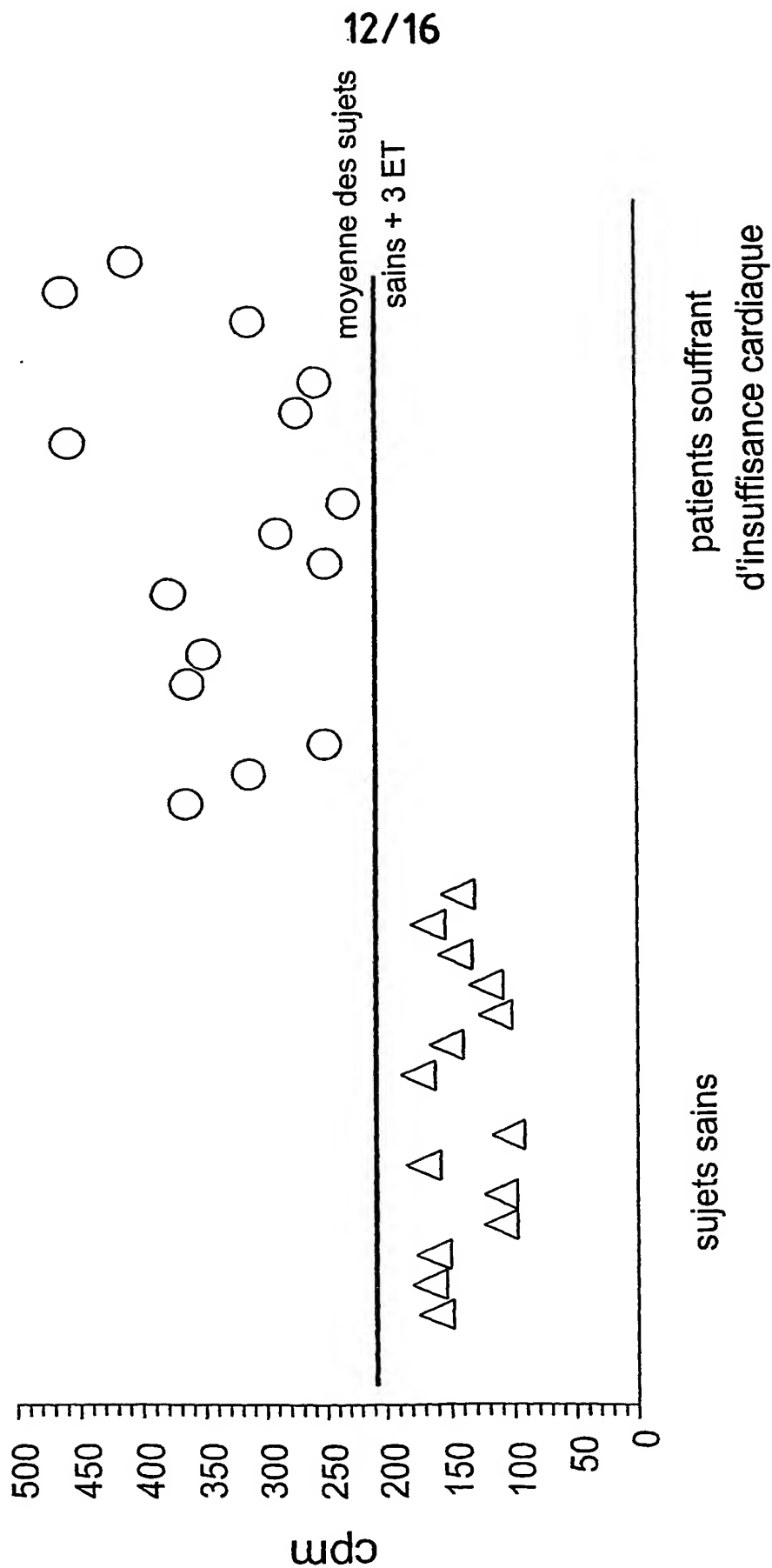


FIG.12

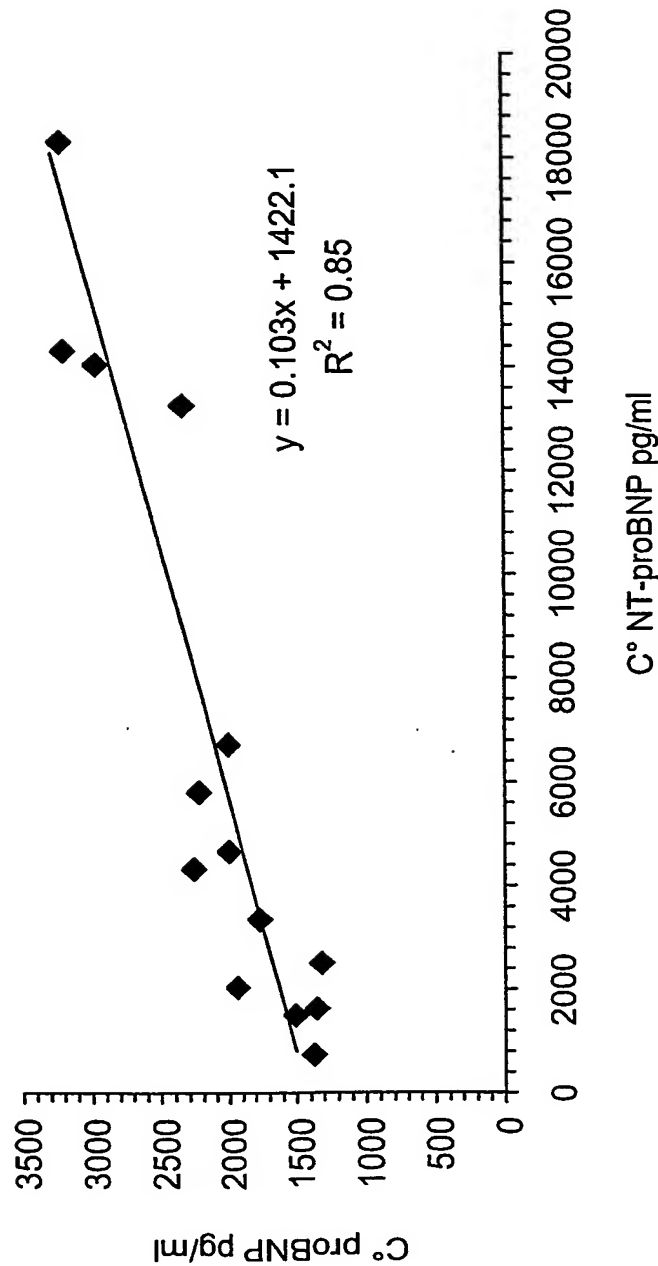


FIG.13

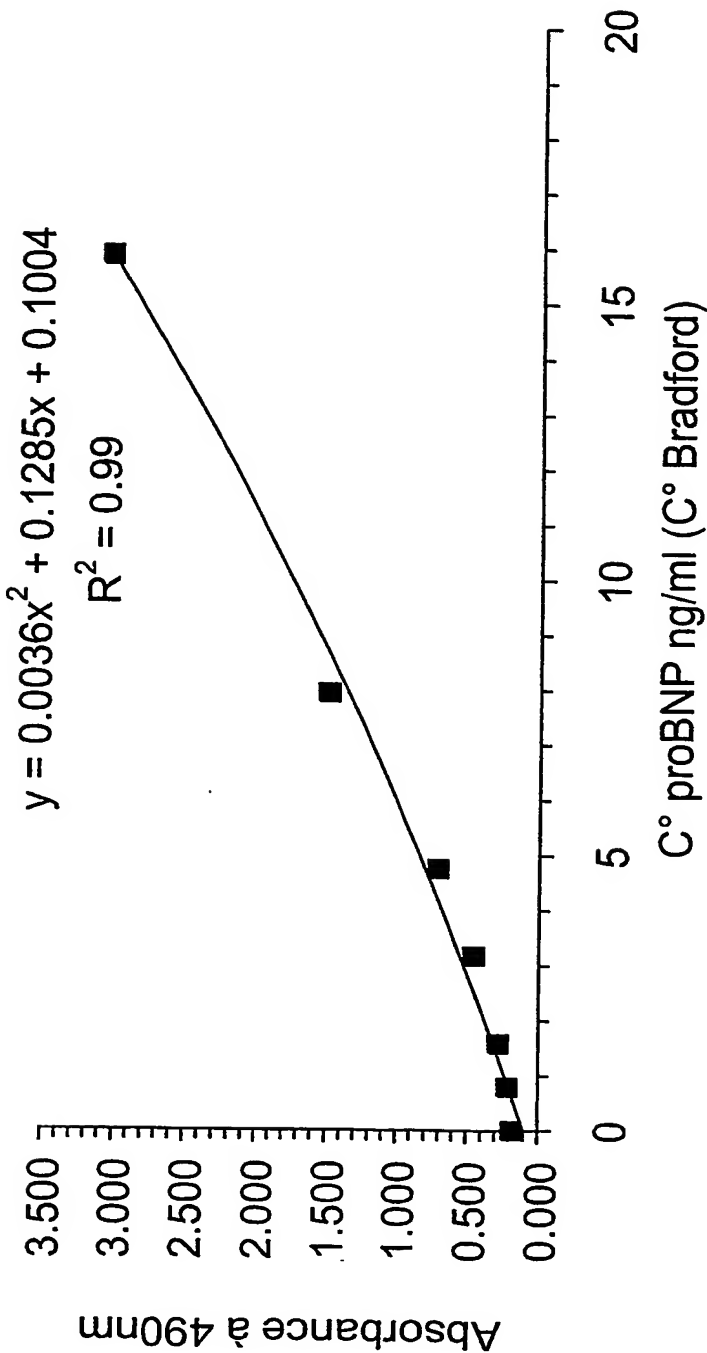


FIG.14

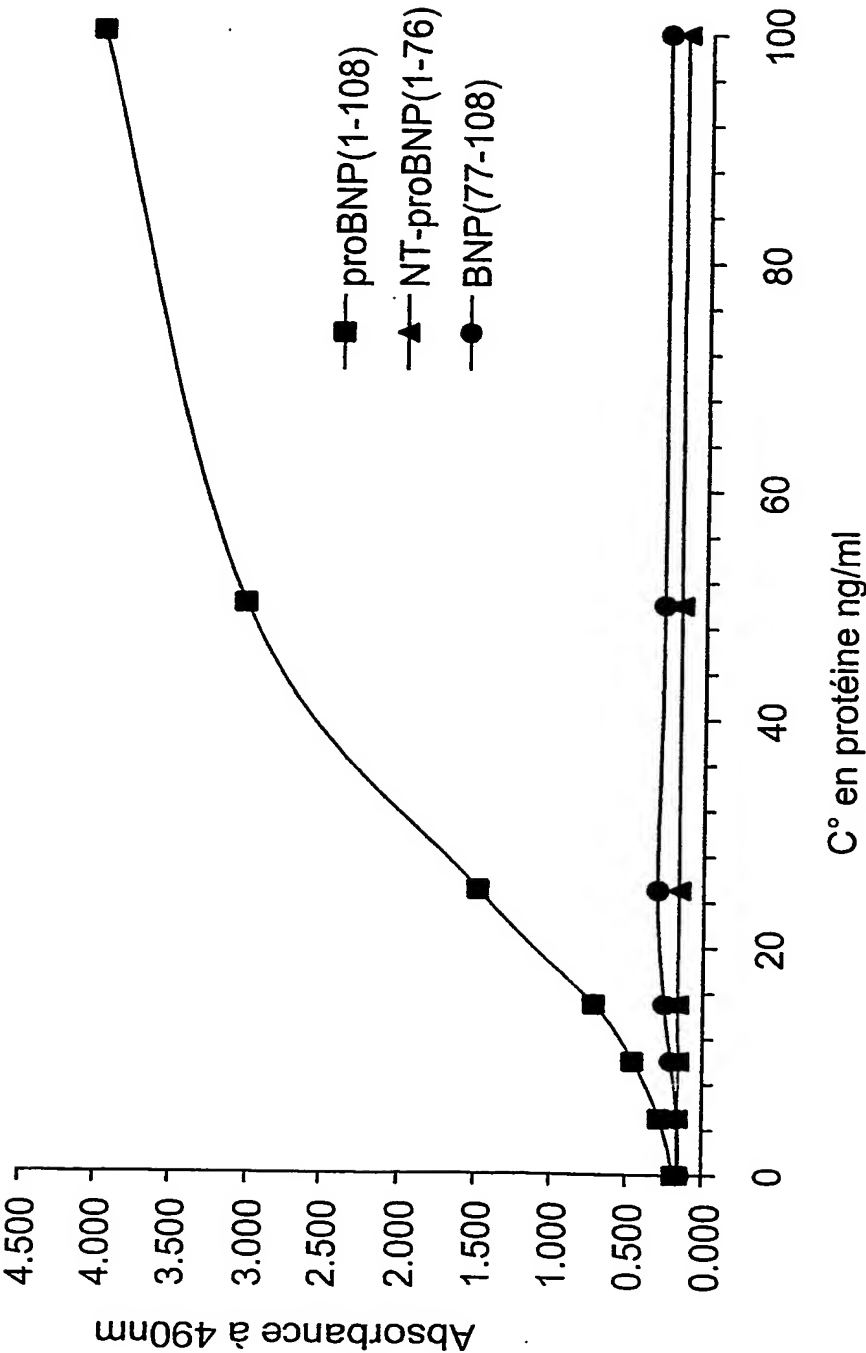
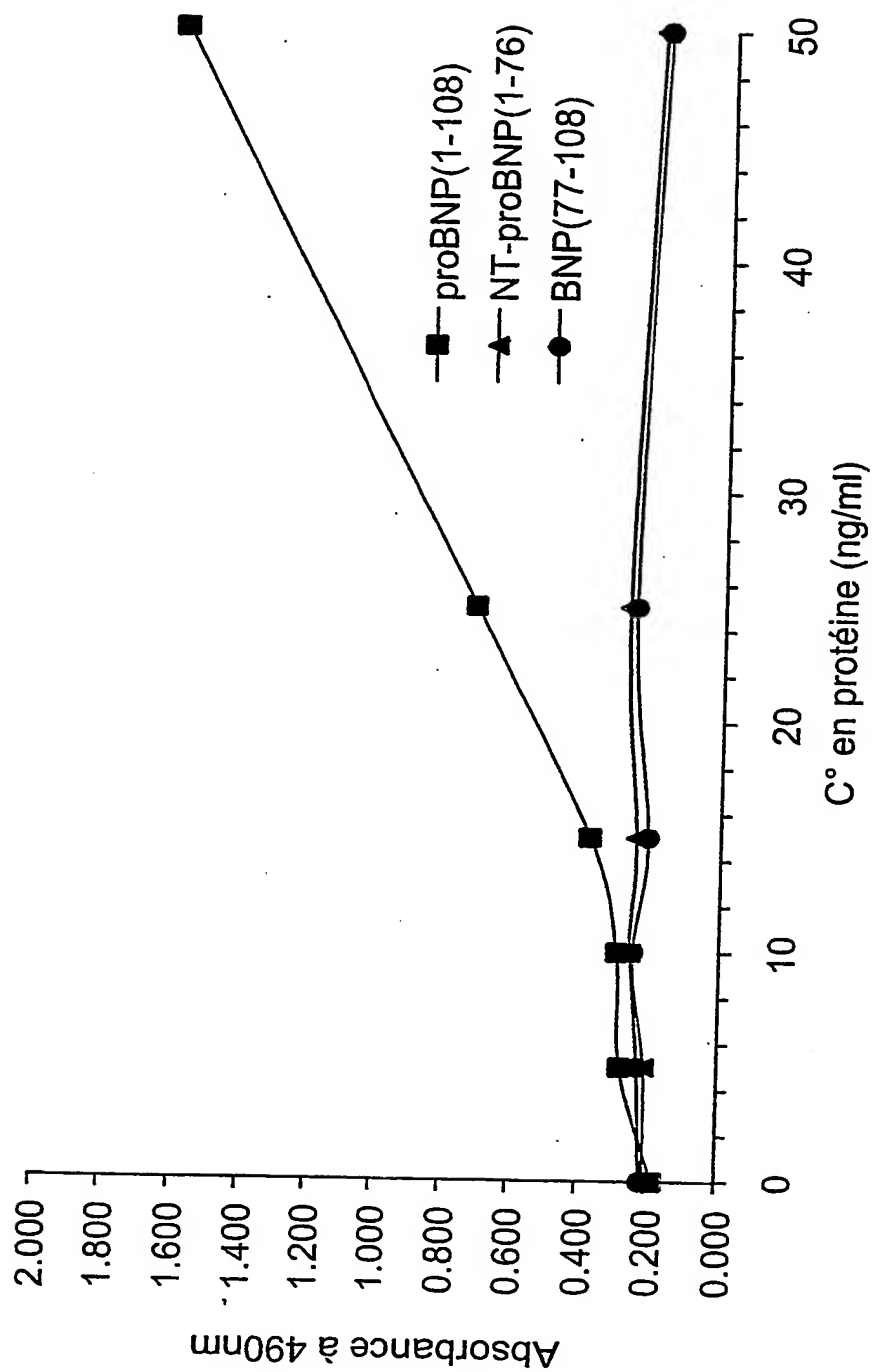


FIG.15

16/16

**FIG.16**

SEQUENCE LISTING

<110> BIO-RAD PASTEUR
CNRS

Université de Montpellier

<120> Anticorps spécifiques pour le diagnostic de l'insuffisance cardiaque

<130> BET 03P0750

<150> FR 0210063

<151> 2002-08-07

<160> 124

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens : proBNP(1-108)

<400> 1

His Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly
1 5 10 15

Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln
20 25 30

Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr
35 40 45

Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His
50 55 60

Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met
 65 70 75 80

Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser
 85 90 95

Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
 100 105

<210> 2

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens : proBNP(77-108)

<400> 2

Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp
 1 5 10 15

Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
 20 25 30

<210> 3

<211> 76

<212> PRT

<213> Homo sapiens : proBNP(1-76)

<400> 3

His Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly
 1 5 10 15

Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln
 20 25 30

Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr
 35 40 45

Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His
 50 55 60

Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg

65

70

75

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : proBNP(70-85)

<400> 4

Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser	Gly
1				5					10					15	

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : proBNP(73-78)

<400> 5

Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro
1				5	

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 6

Cys	Gly	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro
1				5			

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) .. (1)

<223> ACETYLATION

<400> 7

Cys Gly Arg Ala Pro Arg Ser Pro
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 8

Cys Gly Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) .. (1)

<223> ACETYLATION

<400> 9

Cys Gly Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys
1 5

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 10

Cys	Gly	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val
1				5					10	

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 11

Cys	Gly	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser	Gly
1				5					10					15

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 12

Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Gly	Cys
1				5			

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) .. (1)

<223> ACETYLATION

<400> 13

Arg Ala Pro Arg Ser Pro Gly Cys
1 5

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> ACETYLATION

<400> 14

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys
1 5 10

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 15

Cys His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro
1 5 10 15

Lys

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 16

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser
1 5 10 15

Gly

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 17

Cys Phe Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser
1 5 10 15

Gly

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 18

Cys Phe Ser Ile Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser
1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> bAla

<400> 19

Cys	Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser
1				5					10					15	

Ala

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> bAla

<400> 20

Cys	Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Ala	Thr
1				5					10					15	

Ala

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17) .. (17)

<223> bAla

<400> 21

Cys Phe Ser Ile Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Ala Thr
1 5 10 15

Ala

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 22

Cys Phe Ser Ile Arg Ala Pro Arg Ser Pro Ala Leu Ala Ser Gly Thr
1 5 10 15

Ala

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 23

His Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser
1 5 10 15

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 24

Gly	Ser	Pro	Gly	Ser	Ala	Ser	Asp	Leu	Glu	Thr	Ser	Gly	Leu	Gln
1				5					10					15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 25

Gly	Ser	Ala	Ser	Asp	Leu	Glu	Thr	Ser	Gly	Leu	Gln	Glu	Gln	Arg
1			5						10					15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 26

Ser	Asp	Leu	Glu	Thr	Ser	Gly	Leu	Gln	Glu	Gln	Arg	Asn	His	Leu
1				5					10					15

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 27

Glu	Thr	Ser	Gly	Leu	Gln	Glu	Gln	Arg	Asn	His	Leu	Gln	Gly	Lys
1				5					10					15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 28

Gly	Leu	Gln	Glu	Gln	Arg	Asn	His	Leu	Gln	Gly	Lys	Leu	Ser	Glu
1				5					10					15

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 29

Glu	Gln	Arg	Asn	His	Leu	Gln	Gly	Lys	Leu	Ser	Glu	Leu	Gln	Val
1				5					10					15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 30

Asn	His	Leu	Gln	Gly	Lys	Leu	Ser	Glu	Leu	Gln	Val	Glu	Gln	Thr
1				5					10					15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 31

Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu
1 5 10 15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 32

Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu Gln
1 5 10 15

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 33

Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro
1 5 10 15

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 34

Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr
1 5 10 15

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 35

Ser	Leu	Glu	Pro	Leu	Gln	Glu	Ser	Pro	Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Trp
1				5					10					15

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 36

Pro	Leu	Gln	Glu	Ser	Pro	Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Trp	Lys	Ser	Arg
1				5					10					15

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 37

Glu	Ser	Pro	Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Trp	Lys	Ser	Arg	Glu	Val	Ala
1				5					10					15

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 38

Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Trp	Lys	Ser	Arg	Glu	Val	Ala	Thr	Glu	Gly
1				5					10					15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 39

Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly
1 5 10 15

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 40

Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His Arg Lys
1 5 10 15

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 41

Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu
1 5 10 15

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 42

Thr Glu Gly Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu
1 5 10 15

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 43

Ile	Arg	Gly	His	Arg	Lys	Met	Val	Leu	Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro
1				5					10					15

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 44

His	Arg	Lys	Met	Val	Leu	Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro
1				5					10					15

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 45

Met	Val	Leu	Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val
1				5					10					15

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 46

Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 47

Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser	Gly	Cys	Phe
1				5					10					15

<210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 48

Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser	Gly	Cys	Phe	Gly	Arg	Lys
1				5					10					15

<210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 49

Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser	Gly	Cys	Phe	Gly	Arg	Lys	Met	Asp	Arg
1				5					10					15

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 50

Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser

1 5 10 15

<210> 51

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 51

Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly
1 5 10 15

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 52

Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys
1 5 10 15

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 53

Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu
1 5 10 15

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 54

Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Leu	Gly	Cys	Lys	Val	Leu	Arg	Arg	His
1				5					10					15

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 55

Ala	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 56

Tyr	Ala	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 57

Tyr	Thr	Ala	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 58

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 58

Tyr Thr Leu Ala Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser
1 5 10 15

<210> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 59

Tyr Thr Leu Arg Gly Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser
1 5 10 15

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 60

Tyr Thr Leu Arg Ala Ala Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser
1 5 10 15

<210> 61

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 61

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Ala Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser
1 5 10 15

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 62

Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ala	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 63

Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Ala	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 64

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 64

Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Ala	Met	Val	Gln	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 65

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 65

Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Ala	Val	Gln	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 66

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 66

Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Ala	Gln	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 67

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 67

Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Ala	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 68

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 68

Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Ala	Ser
1				5					10					15

<210> 69

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 69

Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ala
1				5					10					15

<210> 70

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 70

Pro	Leu	Gly	Ser	Pro	Gly	Ser	Ala	Ser	Asp	Leu	Glu	Thr	Ser	Gly
1				5					10					15

<210> 71

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 71

Leu	Gly	Ser	Pro	Gly	Ser	Ala	Ser	Asp	Leu	Glu	Thr	Ser	Gly	Leu
1				5					10					15

<210> 72

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 72

Ser	Pro	Gly	Ser	Ala	Ser	Asp	Leu	Glu	Thr	Ser	Gly	Leu	Gln	Glu
1				5					10					15

<210> 73

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 73

Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln
1 5 10 15

<210> 74

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 74

Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn
1 5 10 15

<210> 75

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 75

Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His
1 5 10 15

<210> 76

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 76

Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu
1 5 10 15

<210> 77

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 77

Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln
1 5 10 15

<210> 78

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 78

Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly
1 5 10 15

<210> 79

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 79

Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu
1 5 10 15

<210> 80

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 80

Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln
1 5 10 15

<210> 81

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 81

Gln	Arg	Asn	His	Leu	Gln	Gly	Lys	Leu	Ser	Glu	Leu	Gln	Val	Glu
1				5				10						15

<210> 82

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 82

Arg	Asn	His	Leu	Gln	Gly	Lys	Leu	Ser	Glu	Leu	Gln	Val	Glu	Gln
1				5				10						15

<210> 83

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 83

His	Leu	Gln	Gly	Lys	Leu	Ser	Glu	Leu	Gln	Val	Glu	Gln	Thr	Ser
1				5				10						15

<210> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 84

Leu	Gln	Gly	Lys	Leu	Ser	Glu	Leu	Gln	Val	Glu	Gln	Thr	Ser	Leu
1				5				10						15

<210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 85

Gln	Gly	Lys	Leu	Ser	Glu	Leu	Gln	Val	Glu	Gln	Thr	Ser	Leu	Glu
1				5					10					15

<210> 86

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 86

Gly	Lys	Leu	Ser	Glu	Leu	Gln	Val	Glu	Gln	Thr	Ser	Leu	Glu	Pro
1				5					10					15

<210> 87

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 87

Lys	Leu	Ser	Glu	Leu	Gln	Val	Glu	Gln	Thr	Ser	Leu	Glu	Pro	Leu
1				5					10					15

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 88

Leu	Glu	Pro	Leu	Gln	Glu	Ser	Pro	Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Trp	Lys
1				5					10					15

<210> 89

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 89

Glu	Pro	Leu	Gln	Glu	Ser	Pro	Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Trp	Lys	Ser
1				5					10					15

<210> 90

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 90

Pro	Leu	Gln	Glu	Ser	Pro	Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Trp	Lys	Ser	Arg
1				5					10					15

<210> 91

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 91

Leu	Gln	Glu	Ser	Pro	Arg	Pro	Thr	Gly	Val	Trp	Lys	Ser	Arg	Glu
1				5					10					15

<210> 92

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 92

1 5 10 15
Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val

<210> 93

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 93

1 5 10 15
Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala

<210> 94

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 94

1 5 10 15
Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr

<210> 95

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 95

1 5 10 15
Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu

<210> 96

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 96

Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile
1 5 10 15

<210> 97

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 97

Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg
1 5 10 15

<210> 98

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 98

Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro
1 5 10 15

<210> 99

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 99

Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg
1 5 10 15

<210> 100

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 100

Gly	His	Arg	Lys	Met	Val	Leu	Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser
1				5					10					15

<210> 101

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 101

Arg	Lys	Met	Val	Leu	Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys
1				5					10					15

<210> 102

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 102

Lys	Met	Val	Leu	Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met
1				5					10					15

<210> 103

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 103

Val	Leu	Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln
1				5					10					15

<210> 104

<211> 35

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 104

Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp
1 5 10 15

Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
20 25 30

Lys Lys Lys
35

<210> 105

<211> 10

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 105

Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys
1 5 10

<210> 106

<211> 12

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 106

Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg
1 5 10

<210> 107

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 107

His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg
1 5 10

<210> 108

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 108

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser
1 5 10 15

<210> 109

<211> 16

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 109

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser
1 5 10 15

<210> 110

<211> 11

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 110

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys
1 5 10

<210> 111

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 111

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val
1 5 10

<210> 112

<211> 14

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 112

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln
1 5 10

<210> 113

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 113

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly
1 5 10 15

<210> 114

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) .. (1)

<223> ACETYLATION

<400> 114

Cys Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln
1 5 10

<210> 115

<211> 14

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 115

Cys Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly
1 5 10

<210> 116

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 116

Cys Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser
1 5 10 15

<210> 117

<211> 16

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 117

Cys Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly
1 5 10 15

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 118

Cys Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val
1 5 10

<210> 119

<211> 12

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 119

Cys Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln
1 5 10

<210> 120

<211> 12

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 120

Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Cys
1 5 10

<210> 121

<211> 14

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 121

Cys Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser
1 5 10

<210> 122

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 122

Cys	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser	Gly
1				5					10					15

<210> 123

<211> 11

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 123

Leu	Gln	Glu	Gln	Arg	Asn	His	Leu	Gln	Gly	Lys
1				5					10	

<210> 124

<211> 12

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 124

Leu	Glu	Pro	Leu	Gln	Glu	Ser	Pro	Arg	Pro	Thr	Gly
1				5					10		

Rec'd PCT 03 FEB 2005

037523400

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
19 février 2004 (19.02.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/014952 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C07K 16/26, C12N 5/12, G01N 33/53, C07K 7/06,
7/08, 16/06, G01N 33/74, C12N 5/20

(74) Mandataires : BERNASCONI, Jean etc.; CABINET
LAVOIX, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 PARIS
CEDEX 09 (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/002483

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international : 7 août 2003 (07.08.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02 10063 7 août 2002 (07.08.2002) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) :
BIO-RAD PASTEUR [FR/FR]; 3, boulevard Raymond
Poincaré, F-92430 MARNES LA COQUETTE (FR).
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCI-
ENTIFIQUE (C.N.R.S) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange,
F-75016 PARIS (FR). UNIVERSITE MONTPELLIER I
[FR/FR]; Boulevard Henri IV, F-34060 MONTEPELLIER
CEDEX 1 (FR).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : PAU,
Bernard [FR/FR]; Le Mas Clos n°6, Rue Sainte
Geneviève, F-34080 MONTPELLIER (FR). GIULIANI,
Isabelle [FR/FR]; Résidence Occitanie, 200, avenue du
Major Flandre, F-34090 MONTPELLIER (FR). RIEU-
NIER, François [FR/FR]; 5, rue du Bois, F-78390 BOIS
D'ARCY (FR).

(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 8 avril 2004

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abrégations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.*

(54) Title: SPECIFIC PROBPNP(1-108) ANTIBODIES FOR DIAGNOSING HEART FAILURE

(54) Titre : ANTICORPS SPECIFIQUES DU PROBPNP (1-108) POUR LE DIAGNOSTIC DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE

(57) Abstract: The invention relates to in vitro diagnosis of heart failure. More specifically, the invention relates to specific anti-
bodies of a peptide domain which is situated on either side of hinge region R76S77 of proBNP(1-108). In particular, the invention
relates to a method of obtaining the aforementioned antibodies and to the use thereof in detecting blood proBNP(1-108) with the
exception of BNP(1-76) and BNP(77-108). The invention also relates to a method of detecting blood proBNP(1-108), reagents and
a kit for same.

(57) Abrégé : L'invention concerne le domaine du diagnostic in vitro de l'insuffisance cardiaque. L'invention concerne plus particu-
lièrement des anticorps spécifiques d'un domaine peptidique situé de part et d'autre de la zone charnière R76S77 du proBNP(1-108).
L'invention concerne plus particulièrement un procédé d'obtention de ces anticorps et leur utilisation pour détecter le proBNP(1-108)
sanguin à l'exclusion du BNP(1-76) et du BNP(77-108). L'invention concerne aussi un procédé de détection du proBNP(1-108) san-
guin, des réactifs et une trousse pour le mettre en oeuvre.

WO 2004/014952 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC 03/02483

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K16/26 C12N5/12 G01N33/53 C07K7/06 C07K7/08
C07K16/06 G01N33/74 C12N5/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00 45176 A (GALLUSSER ANDREAS ;KARL JOHANN (DE); LILL HELMUT (DE); STAHL PETER) 3 August 2000 (2000-08-03) page 1, line 1 -page 5, line 17; claims 1-19	1-35
A	US 6 117 644 A (DEBOLD ADOLFO J) 12 September 2000 (2000-09-12) column 1, line 28 -column 2, line 20; claims 1-27	1-35

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 February 2004

Date of mailing of the international search report

03/03/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Flao, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC 03/02483

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GOETZE JENS PETER ET AL: "Quantification of pro-B-type natriuretic peptide and its products in human plasma by use of an analysis independent of precursor processing." CLINICAL CHEMISTRY. UNITED STATES JUL 2002, vol. 48, no. 7, July 2002 (2002-07), pages 1035-1042, XP001149219 ISSN: 0009-9147 page 1035, right-hand column, paragraph 2 -page 1036, left-hand column, paragraph 2 ----	1-35
A	WO 00 35951 A (NG LEONG LOKE ;UNIV LEICESTER (GB)) 22 June 2000 (2000-06-22) claims 1-18 ----	1-35
A	US 6 162 902 A (SCARDINA JAN MARIAN ET AL) 19 December 2000 (2000-12-19) claims 1-8 -----	1-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC 03/02483

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0045176	A	03-08-2000	AU 758562 B2	27-03-2003
			AU 2545100 A	18-08-2000
			CA 2359667 A1	03-08-2000
			CN 1339107 T	06-03-2002
			WO 0045176 A2	03-08-2000
			EP 1151304 A2	07-11-2001
			HU 0105195 A2	29-04-2002
			JP 2003508724 T	04-03-2003
			NO 20013698 A	28-09-2001
			NZ 512762 A	28-02-2003
			ZA 200106193 A	02-05-2002
<hr/>				
US 6117644	A	12-09-2000	NONE	
<hr/>				
WO 0035951	A	22-06-2000	AU 1670300 A	03-07-2000
			WO 0035951 A1	22-06-2000
<hr/>				
US 6162902	A	19-12-2000	US 6376207 B1	23-04-2002
			AU 1981597 A	22-09-1997
			CA 2248140 A1	12-09-1997
			EP 0914344 A1	12-05-1999
			JP 2000507094 T	13-06-2000
			WO 9732900 A1	12-09-1997
			US 6124430 A	26-09-2000
			ZA 9701864 A	18-12-1997
<hr/>				

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. No internationale
PCT/SA 03/02483

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C07K16/26 C12N5/12 G01N33/53 C07K7/06 C07K7/08 C07K16/06 G01N33/74 C12N5/20		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 00 45176 A (GALLUSSER ANDREAS ;KARL JOHANN (DE); LILL HELMUT (DE); STAHL PETER) 3 août 2000 (2000-08-03) page 1, ligne 1 -page 5, ligne 17; revendications 1-19 ---	1-35
A	US 6 117 644 A (DEBOLD ADOLFO J) 12 septembre 2000 (2000-09-12) colonne 1, ligne 28 -colonne 2, ligne 20; revendications 1-27 --- <div style="text-align: center;">-/--</div>	1-35
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
* Catégories spéciales de documents cités: <div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">19 février 2004</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">03/03/2004</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Le Flao, K</div>

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	GOETZE JENS PETER ET AL: "Quantification of pro-B-type natriuretic peptide and its products in human plasma by use of an analysis independent of precursor processing." CLINICAL CHEMISTRY. UNITED STATES JUL 2002, vol. 48, no. 7, juillet 2002 (2002-07), pages 1035-1042, XP001149219 ISSN: 0009-9147 page 1035, colonne de droite, alinéa 2 -page 1036, colonne de gauche, alinéa 2 ----	1-35
A	WO 00 35951 A (NG LEONG LOKE ;UNIV LEICESTER (GB)) 22 juin 2000 (2000-06-22) revendications 1-18 ----	1-35
A	US 6 162 902 A (SCARDINA JAN MARIAN ET AL) 19 décembre 2000 (2000-12-19) revendications 1-8 -----	1-35

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Document internationale No

PCT/03/02483

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0045176 A	03-08-2000	AU 758562 B2 AU 2545100 A CA 2359667 A1 CN 1339107 T WO 0045176 A2 EP 1151304 A2 HU 0105195 A2 JP 2003508724 T NO 20013698 A NZ 512762 A ZA 200106193 A	27-03-2003 18-08-2000 03-08-2000 06-03-2002 03-08-2000 07-11-2001 29-04-2002 04-03-2003 28-09-2001 28-02-2003 02-05-2002
US 6117644 A	12-09-2000	AUCUN	
WO 0035951 A	22-06-2000	AU 1670300 A WO 0035951 A1	03-07-2000 22-06-2000
US 6162902 A	19-12-2000	US 6376207 B1 AU 1981597 A CA 2248140 A1 EP 0914344 A1 JP 2000507094 T WO 9732900 A1 US 6124430 A ZA 9701864 A	23-04-2002 22-09-1997 12-09-1997 12-05-1999 13-06-2000 12-09-1997 26-09-2000 18-12-1997